

明 細 書

発明の名称： c-Met タンパク質結合ペプチド複合体

技術分野

[0001] この発明は、c-Met タンパク質に結合するペプチドを含む複合体などに関する。

背景技術

[0002] 近年、病気や外傷などによる損傷を受けたからだの組織を再生することを目指す、再生医療が注目されている。再生医療は自己の細胞を用いて組織を再生するため、他者からの臓器移植などの従来法に比べ免疫の問題が起こりにくいという利点をもつ。それら再生医療では、幹細胞などのヒト由来の細胞を培養し、目的の組織に分化させることが必要である。また、再生医療のさらなる改良技術を生み出すために、培養した哺乳類細胞、特にヒト由来の細胞を用いた基礎研究が続けられている。

これら再生医療や研究においては、目的となる細胞を効率的に培養し増殖させる工程が重要となる。

幹細胞をはじめヒト細胞の培養において培地成分は重要な役割を果たしているが、特にその中でも成長因子（GFと称することもある）は最も重要な要素のひとつである。しかし、成長因子は一般的に非常に高価であり、かつ、例えば幹細胞を用いた研究においては未分化状態の細胞を維持するなどのために多量が必要となる。

また、成長因子の一つ肝細胞増殖因子（HGF：hepatocyte growth factor receptor）とその受容体であるc-Met（c-Met又はMetと称することもある）は、医薬品のターゲットとしても研究が進んでいる。

c-Metは1回膜貫通型の受容体型チロシンキナーゼで、リガンドであるHGFがc-METに結合すると、c-METは二量体化し活性化される。c-Metの活性化は胚発生、器官形成、創傷治癒に必須であることが知

られており、例えばHGFと受容体c-Metの結合は、関連するシグナル伝達経路を活性化し、特異的に内皮細胞の増殖及び機能を促進・維持し、血管新生を促進し、さらに血管新生から側副循環を形成することが知られている。そのため、c-Metの活性化作用を有する化合物が求められており、研究が進んでいる。

そのような中、特許文献1では、c-Metアゴニスト活性を有する抗体が報告されている。また、非特許文献1では、現在までに開発が進んでいるHGFの代替物が報告されている。

また近年、低分子や抗体等の高分子に変わる中分子化合物として、ペプチド、特に環状ペプチドの医薬組成物等としての利用が注目されている。例えば、特許文献2及び非特許文献2には、c-Metタンパク質アゴニストとして利用可能なペプチド複合体が記載されている。当該c-Metタンパク質アゴニストとして利用可能なペプチド複合体は、細胞の増殖や遊走を促進させることが知られており、この細胞増殖作用を用いて医薬品や細胞培養時の培地組成物など、様々な用途への応用が期待されている。例えば、再生医療に用いられる細胞や組織の培養時に添加する成長因子代替物、臓器移植時の臓器保護剤、再生促進剤、及び肝細胞増殖因子の発現低下を来す疾患のための治療薬としての有用性が挙げられる。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：特表2021-50793

特許文献2：特許第6426103号公報

非特許文献1：THE CHEMICAL TIMES（関東化学株式会社）
2020 No. 2 p. 6-11 特集 再生医療関連技術 化学合成可能な増殖因子代替化合物の開発 植木 亮介及び山東 信介

非特許文献2：Ito, K. et. al., Nature communications, 6, Article number: 6373
(2015)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 前述のとおり、幹細胞をはじめとする細胞の培養において、高価な成長因子を加える必要があり、それが幹細胞などの医療応用を困難にしていた。また、成長因子は医薬品としての可能性も大きいため、安価で安定的に提供可能な成長因子の代替物の開発が望まれている。そのような状況の中、上記の公報に記載があるとおり、c-Metタンパク質に結合するペプチドを含むc-Metタンパク質アゴニストとして利用可能なペプチド複合体が見出された。しかしながら、上記公報に記載されているペプチド複合体のなかにはヒトHGFと比べ低い活性を示すものがあるため、当該ペプチド複合体以外のc-Metタンパク質に結合する複合体の開発が望まれた。

[0005] この明細書に記載された発明は、上記のいずれか1つ又は2つ以上を解決することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] この発明は、基本的には、配列番号1で示されるペプチドがc-Metタンパク質と結合するという実施例による知見に基づく。

[0007] また、この発明は、基本的には、上記のペプチドをリンカーで結合させ、ダイマー構造をとるように設計したペプチド複合体が、c-Metタンパク質アゴニストとして機能するという実施例による知見に基づく。

[0008] 第1の発明は、c-Metタンパク質と結合するペプチドAを含むペプチド複合体に関する。

ペプチドAは、 $X^1-X^2-X^3-V-S-X^4-D-X^5-D-X^6-P-R-W-X^7-MeC$ （配列番号1）に記載のアミノ酸配列からなるペプチドであるか、又は配列番号1に記載のアミノ酸配列において1～3個のアミノ酸が、置換、欠失、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなるc-Metタンパク質と結合するペプチドである。

X^1 は、N-アルキル化されてもよいアミノ酸である。

X^2 は、任意のアミノ酸である。

X³は、任意のアミノ酸である。

X⁴は、N-アルキル化されてもよい疎水性アミノ酸である。

X⁵は、任意のアミノ酸である。

X⁶は、置換を有してもよいアルキル鎖を側鎖に有するアミノ酸又はSである。

X⁷は、任意のアミノ酸である。

発明の効果

[0009] この発明によれば、c-Metタンパク質に結合する新規なペプチドを含む複合体を提供できる。

[0010] また、この発明によれば、c-Metアゴニスト活性を有する新規なペプチド複合体を提供できる。

[0011] さらに、この発明によれば、c-Metアゴニスト活性を有する新規なペプチド複合体を含む、再生医療に用いられる細胞や組織の培養時に添加する成長因子の代替物としての細胞又は組織培養用の培地組成物を提供できる。これは、例えば、臓器移植時の臓器保護剤、再生促進剤としても利用可能である。

[0012] また、この発明によれば新規なc-Metタンパク質アゴニストやそのようなc-Metタンパク質アゴニストを含む医薬組成物を提供できる。これは、例えば、肝細胞増殖因子（HGF）の発現低下を来す疾患のための治療薬として有用である。

[0013] さらに、この発明によれば、細胞の増殖を促進させる新規なc-Metタンパク質アゴニストを含む医薬組成物を提供できる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]図1は、本発明のペプチド複合体及びヒトHGFを用いた、ホスホー-c-Met AlphaLISAアッセイによるc-Metアゴニスト活性測定の結果を示す。図中、黒四角はc-Metアゴニスト活性ペプチド複合体（ペプチド（配列番号34）とリンカー（配列番号37）の複合体（GFs__c-Met-00014336-PEG13ダイマー；表4における複合

体No. 49)を示し、XはヒトHGFを示す。横軸はペプチド複合体又はヒトHGFの濃度(nM)を、縦軸はヒトHGFで誘導される活性化シグナルの最大値を100としたときの活性化シグナルの相対値を示す。

[図2]図2は、本発明のペプチド複合体及びヒトHGFを用いた、HUEC細胞増殖評価によるc-Metアゴニスト活性測定の結果を示す。図中、黒四角はc-Metアゴニスト活性ペプチド複合体(ペプチド(配列番号34)とリンカー(配列番号37)の複合体(GFs__c-Met-00014336-PEG13ダイマー;表4における複合体No. 49)を示し、XはヒトHGFを示す。横軸はペプチド複合体又はヒトHGFの濃度(nM)を、縦軸はヒトHGFで誘導される活性化シグナルの最大値を100としたときの活性化シグナルの相対値を示す。

[図3]図3は、本発明のペプチド複合体、ヒトHGF及びヒト上皮成長因子(EGF)を用いた、ヒト近位尿細管上皮細胞の管腔形成評価試験における3日後の結果を示す。

[図4]図4は、本発明のペプチド複合体、ヒトHGF及びヒト上皮成長因子(EGF)を用いた、ヒト近位尿細管上皮細胞の管腔形成評価試験における8日後の結果を示す。図中、黒矢印は分岐を有する管腔形成を示す。

[図5]図5は、本発明のペプチド複合体及びヒトHGFを用いた、ヒトPhospho-RTKアレイアッセイ評価の結果を示す。図5(1)はアレイマップを示し、図5(2)は評価結果を示す。図中、黒四角はHGF Rに対する抗体が固定されたウェルを示す。

発明を実施するための形態

[0015] 以下、本発明を実施するための形態について説明する。本発明は、以下に説明する形態に限定されるものではなく、以下の形態から当業者が自明な範囲で適宜修正したものも含む。

[0016] 第1の発明は、c-Metタンパク質と結合するペプチドAを含むペプチド複合体に関する。

[0017] c-Metタンパク質

c-Met タンパク質は、肝細胞増殖因子（HGF）受容体であり、チロシンキナーゼ活性を有する。c-Met タンパク質は、ジスルフィド結合で結合した α サブユニット及び β サブユニットで構成される膜貫通型受容体である。c-Met タンパク質は、生体内で、HGFが結合することにより二量体化され、続いて自己リン酸化が起こり、各種のシグナル伝達が活性化される。その結果、MAPK経路やAkt経路のシグナル伝達が活性化されることにより、細胞増殖が促進される一方で、細胞のアポトーシス誘導が阻害される。この機能を亢進させて細胞の増殖や遊走を促進させることができれば、再生医療に用いられる細胞製剤などの製造や、肝硬変などの難治性臓器疾患の治療を促進できる可能性がある。

c-Met タンパク質は、c-Met、MET又はHGF-Rともよばれる。ヒトのc-Met タンパク質のGenBankアクセッション番号はNP_000236であり、マウスのc-Met タンパク質のGenBankアクセッション番号はNP_032617である。

[0018] 肝細胞増殖因子（HGF）

肝細胞増殖因子（HGF）は、多機能サイトカインとして、広範な組織および細胞種に対する増殖因子として機能する因子であり、分子量約6万の重鎖と約3.5万の軽鎖がジスルフィド結合したヘテロダイマー構造を有する。HGFは上皮系細胞、内皮細胞や間葉系細胞の増殖を促進することが知られており、他にも形態形成誘導、細胞運動性亢進、抗アポトーシスや血管新生作用などの働きを有する。ヒトのHGFのGenBankアクセッション番号はNP_000592であり、マウスのHGFのGenBankアクセッション番号はNP_001276387である。ヒトHGFであることが好ましく、本明細書において特記しない限りHGFはヒトHGFを示す。

[0019] c-Met タンパク質と結合

c-Met タンパク質と結合するとは、ペプチド又はペプチド複合体が、c-Met タンパク質と結合することを意味する。c-Met タンパク質と結合するか否かは、公知の分子間結合を測定する方法によって測定すること

ができ、例えば、表面プラズモン共鳴（SPR）アッセイ、スキャチャード解析ならびに／または放射免疫アッセイ（RIA）、酵素免疫アッセイ（EIA）およびサンドイッチ競合アッセイなどの競合結合アッセイ、ならびに当技術分野でそれ自体公知であるその異なるバリエーションを含む、それ自体公知である任意の適切な様式で決定することが可能である。好ましくは、例えば、特許第6426103号公報（特許文献2）に記載された表面プラズモン共鳴（SPR）分光による評価である。また、c-Metアゴニスト活性を有する化合物は、c-Metタンパク質と結合することでc-Metアゴニスト活性を示すため、c-Metアゴニスト活性を評価すること、すなわちc-Metアゴニスト活性の有無により、当該ペプチド又は複合体が、c-Metタンパク質と結合したか否かを間接的に評価することが可能である。なお、複合体においては、当該複合体の一部又は全部がc-Metタンパク質に結合可能であれば当該複合体はc-Metタンパク質と結合するという。例えば、当該複合体がペプチドAを含む場合においては、当該複合体におけるペプチドAの部分が、c-Metタンパク質と結合する部位であってもよく、当該複合体に含まれる他の部分もc-Metタンパク質に結合してもよい。

[0020] c-Metアゴニスト活性

c-Metアゴニスト活性とは、c-Metタンパク質と結合し、HGFが有する活性と類似の影響を示す活性をいう。ペプチド又はペプチド複合体がc-Metアゴニスト活性を有するか否かは、公知の方法によって測定することができる。例えば、実施例に示されるように、ホスホ-c-Met AlphaLISAアッセイや、HUVEC細胞増殖試験などを用いて、c-Metアゴニスト活性を評価できる。また、特許第6426103号公報（特許文献2）に記載されたELISA法を用いて、c-Metのリン酸化能を評価することもできる。

[0021] c-Metアゴニスト活性を有するペプチド複合体が治癒できる疾病

c-Metアゴニスト活性を有するペプチド複合体が治癒できる疾病の例

は、虚血性心疾患、急性肝炎、劇症肝炎、肝硬変、胆道閉鎖症、脂肪肝、急性腎不全、慢性腎不全、糖尿病性腎症、急性肺炎、肺線維症、血管障害、心筋梗塞、拡張型心筋症、皮膚潰瘍、脳梗塞、閉塞性動脈硬化症、胃潰瘍及び筋萎縮性側索硬化症などであり、それら疾病の治療に使用できる。

[0022] ペプチド複合体

ペプチド複合体は、c-Met タンパク質と結合するペプチドAを含むペプチド複合体である。このペプチド複合体は、ペプチドAを1つ又は2つ以上含む。ペプチド複合体は、ペプチドAを2つ含むものが好ましい。また、ペプチドAを1つ含むペプチド複合体の例は、限定されるものではないが、例えば、ペプチドAと、c-Met タンパク質に送達したい物質（ペイロード）、例えば公知の医薬組成物等を含むペプチド複合体や、ペプチドAと蛍光タンパク質などのマーカーとなる組成物を含むペプチド複合体である。公知の医薬組成物とペプチドAとの複合体の場合は、ペプチドAのc-Met タンパク質への結合能を利用して、c-Met に送達したい医薬組成物をc-Met タンパク質に送達することが可能となる。

c-Met タンパク質に送達したい物質としては特に限定はなく、当業者の希望する何らの物質であってよい。該物質の例としては、限られないが、以下が挙げられる：

化合物：低分子化合物、中分子化合物だけではなく、細胞のサイトーシス機構で導入可能な化合物であれば何でもよい。例えば公知の低分子薬剤が挙げられる。

ペプチド：体内の標的に結合して何らかの効果を示すペプチドであってよく、例えば環状ペプチドであってよい。

R1：放射性同位元素でラベルした低分子、中分子化合物や抗体等、放射性同位元素でラベルできる化合物であれば何でもよい。例えば、PET検査用の化合物が挙げられる。

タンパク質：抗体、酵素等の、体内にて有用な機能を示すタンパク質であれば何でもよい。例えば、酵素補充療法に用いられる酵素が挙げられる。

核酸：DNA，RNA等，塩基配列を含むものであれば何でもよい。例えば，核酸医薬品が挙げられる。

DDS：リボソームやミセルなどのDDS分子であってよい。当該DDS分子には内部にさらに医薬品などの化合物が含まれていてもよい。

及び，上記に挙げたそれらの複合体であってよい。

[0023] ペプチド複合体の例は，（１）第１のペプチドと，（２）第２のペプチドと，（３）第１のペプチド及び第２のペプチドをつなぐリンカーを含むペプチド複合体である。

このペプチド複合体は，（１）第１のペプチドと，（２）第２のペプチドと，（３）第１のペプチド及び第２のペプチドをつなぐリンカーのみからなるペプチド複合体であってよい。

このペプチド複合体は，第１のペプチド及び第２のペプチドの少なくとも一方は，ペプチドAである。

第１のペプチド及び第２のペプチドは，同一でも異なってもよいが，ペプチドAであることが好ましい。

つまり，ペプチド複合体は，ヘテロダイマーであってもホモダイマーであってもよい。ヘテロダイマーは，第１のペプチド及び第２のペプチドが，異なるペプチド（例えばアミノ酸配列の異なるペプチドA）である。ホモダイマーは，第１のペプチド及び第２のペプチドが，同じペプチドAである。好ましいペプチド複合体は，ホモダイマーである。

[0024] 第１のペプチド及び第２のペプチドは，同一のペプチドAであり，第１のペプチド及び第２のペプチドのC末端がリンカーと結合した，ペプチド複合体であることが好ましい。特に，第１のペプチド及び第２のペプチドが，環状ペプチドであることが好ましい。

[0025] ペプチドA

この明細書は，ペプチドAを含む複合体のみならずペプチドAも記載する。

ペプチドAは，

(1) $X^1-X^2-X^3-V-S-X^4-D-X^5-D-X^6-P-R-W-X^7-MeC$ (配列番号1)に記載のアミノ酸配列からなるc-Metタンパク質と結合するペプチドであるか、又は

(2) 配列番号1に記載のアミノ酸配列において1〜3個(1個, 2個又は3個)のアミノ酸が、置換, 欠失, 付加又は挿入されたアミノ酸配列からなるc-Metタンパク質と結合するペプチドである。この(2)のペプチドにおいても、配列番号1における4番目のV, 5番目のS, 7番目のD, 9番目のD, 11番目のP, 12番目のR, 13番目のW, 及び15番目のMeCが維持されているものが好ましい。

[0026] X^1 は、N-アルキル化されてもよいアミノ酸であり、好ましくはN-メチル化されてもよいA又はN-メチル化されてもよいFである。さらに好ましい X^1 は、MeF (N-メチル化されたF) である。

X^2 は、任意のアミノ酸であり、好ましくは親水性アミノ酸, 脂肪族・分岐鎖アミノ酸又は芳香族アミノ酸であり、さらに好ましくはV, T, E, Q, 又はWである。最も好ましい X^2 は、Tである。

X^3 は、任意のアミノ酸であり、親水性アミノ酸, 脂肪族アミノ酸又は芳香族アミノ酸であり、さらに好ましくはA, R, Y, 又はDである。最も好ましい X^3 は、Aである。

X^4 は、N-アルキル化されてもよい疎水性アミノ酸であり、好ましくはN-メチル化されてもよい疎水性アミノ酸であり、さらに好ましくはN-メチル化されてもよいF又はN-メチル化されてもよいLである。最も好ましい X^4 は、MeF (N-メチル化されたF) である。

X^5 は、任意のアミノ酸であり、好ましくは親水性アミノ酸, 脂肪族・分岐鎖アミノ酸又はPであり、さらに好ましくはD, E, S, P又はVである。最も好ましい X^5 は、Eである。

X^6 は、置換を有してもよいアルキル鎖を側鎖に有するアミノ酸又はSであり、好ましくは(S)-2-アミノヘプタン酸(Ahp), R, L-ノルロイシン(Nle), (S)-2, 7-ジアミノヘプタン酸(Hty),

又はSである。さらに好ましいX⁶は、A h pである。

X⁷は、任意のアミノ酸であり、好ましくは親水性アミノ酸又は脂肪族アミノ酸であり、さらに好ましくはS、A、L- α -アミノブタン酸(A b u)、D、Q、又はVである。最も好ましいX⁷は、Sである。

[0027] 「N-アルキル化されていてもよいアミノ酸」とは、ペプチド結合を形成する窒素上にアルキル基を持つアミノ酸であるN-アルキルアミノ酸又はアルキル基を持たないアミノ酸を示す。N-アルキルアミノ酸としては、例えば、N-ブチルアミノ酸、N-エチルアミノ酸、N-メチルアミノ酸などが挙げられる。また、「N-メチル化されていてもよい」とは、N-メチル化アミノ酸を含むことを示す。例えば、N-メチル化されていてもよいAとは、アラニン(A)又はN-メチルアラニン(Me A)を示す。

[0028] 「置換を有してもよいアルキル鎖を側鎖に有するアミノ酸」とは、側鎖にアルキル鎖を有するアミノ酸、例えば脂肪族アミノ酸グループに属するアミノ酸や、それらアミノ酸の側鎖アルキル基の末端に官能基が置換されたアミノ酸であり、好ましくは、当該アルキル基に含まれるCが5以上であるアミノ酸である。例えば、A h p、N l e、H t yなどが含まれる。

[0029] ペプチドAの好ましい例は、

(1) M e F - T - A - V - S - M e F - D - E - D - A h p - P - R - W - S - M e C (配列番号34)に記載のアミノ酸配列からなるペプチドであるか、又は

(2) 配列番号34に記載のアミノ酸配列において1〜3個のアミノ酸が、置換、欠失、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、c-M e tタンパク質と結合するペプチドである。

[0030] 保存的アミノ酸置換

特定の配列から、1個、2個又は3個のアミノ酸残基が置換、欠失、付加又は挿入される場合、保存的アミノ酸置換がなされることが好ましい。「保存的アミノ酸置換(conservative amino acid substitution)」とは、機能的に等価または類似のアミノ酸との置換

を意味する。ペプチドにおける保存的アミノ酸置換は、該ペプチドのアミノ酸配列に静的変化をもたらす。例えば、同様の極性を有する一つまたは二つ以上のアミノ酸は機能的に等価に作用し、かかるペプチドのアミノ酸配列に静的変化をもたらす。一般に、あるグループ内の置換は構造および機能について保存的であると考えることができる。しかしながら、当業者には自明であるように、特定のアミノ酸残基が果たす役割は当該アミノ酸を含む分子の三次元構造における意味合いにおいて決定され得る。例えば、システイン残基は、還元型の（チオール）フォームと比較してより極性の低い、酸化型の（ジスルフィド）フォームをとることができる。アルギニン側鎖の長い脂肪族の部分は構造的および機能的に重要な特徴を構成し得る。また、芳香環を含む側鎖（トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン）はイオン-芳香族相互作用または陽イオン- π 相互作用に寄与し得る。かかる場合において、これらの側鎖を有するアミノ酸を、酸性または非極性グループに属するアミノ酸と置換しても、構造的および機能的には保存的であり得る。プロリン、グリシン、システイン（ジスルフィド・フォーム）等の残基は主鎖の立体構造に直接的な効果を与える可能性があり、しばしば構造的ゆがみなしに置換することはできない。

保存的アミノ酸置換は、以下に示すとおり、側鎖の類似性に基づく特異的置換（レーニンジャ、生化学、改訂第2版、1975年刊行、73乃至75頁：L. Lehninger, Biochemistry, 2nd edition, pp73~75, Worth Publisher, New York (1975)) および典型的置換を含む。

[0031] また、保存的アミノ酸置換は、例えば、以下のように天然のアミノ酸をその共通する側鎖の性質に基づいて分けたグループにおいて、あるアミノ酸が属するグループと同じグループに属するアミノ酸への置換が好ましい。

疎水性（非極性とも言う）アミノ酸：疎水性（非極性）を示すアミノ酸であって、アラニン（「A l a」または単に「A」とも記す）、グリシン（「G l y」または単に「G」とも記す）、バリン（「V a l」または単に「V

」とも記す), ロイシン (「L e u」または単に「L」とも記す), イソロイシン (「I l e」または単に「I」とも記す), プロリン (「P r o」または単に「P」とも記す), フェニルアラニン (「P h e」または単に「F」とも記す), トリプトファン (「T r p」または単に「W」とも記す), チロシン (「T y r」または単に「Y」とも記す), メチオニン (「M e t」または単に「M」とも記す) を含む。

なお、疎水性アミノ酸はさらに以下のグループに分けることもできる。

脂肪族アミノ酸：側鎖に脂肪酸又は水素を有するアミノ酸であって, A l a, G l y, V a l, I l e, L e uを含む。

脂肪族・分岐鎖アミノ酸：側鎖に分岐型脂肪酸を有するアミノ酸であって, V a l, I l e, L e uを含む。

芳香族アミノ酸：側鎖に芳香環を有するアミノ酸であって, T r p, T y r, P h eを含む。親水性（極性とも言う）アミノ酸：親水性（極性）を示すアミノ酸であって, セリン (「S e r」または単に「S」とも記す), スレオニン (「T h r」または単に「T」とも記す), システイン (「C y s」または単に「C」とも記す), アスパラギン (「A s n」または単に「N」とも記す), グルタミン (「G l n」または単に「Q」とも記す), アスパラギン酸 (「A s p」または単に「D」とも記す), グルタミン酸 (「G l u」または単に「E」とも記す), リジン (リシンとも記す。「L y s」または単に「K」とも記す), アルギニン (「A r g」または単に「R」とも記す), ヒスチジン (「H i s」または単に「H」とも記す) を含む。

なお、親水性アミノ酸はさらに以下のグループに分けることもできる。

酸性アミノ酸：側鎖が酸性を示すアミノ酸であって, A s p, G l uを含む,

塩基性アミノ酸：側鎖が塩基性を示すアミノ酸であって, L y s, A r g, H i sを含む。

中性アミノ酸：側鎖が中性を示すアミノ酸であって, S e r, T h r, A s n, G l n, C y sを含む。

また、G l y及びP r oについては、「主鎖の方角に影響を与えるアミノ酸」に分けることもでき、側鎖に硫黄分子を含むアミノ酸、C y s及びM e tは、「含硫アミノ酸」に分けることもできる。

[0032] 本明細書において、「アミノ酸」は、天然のアミノ酸のみならず、非天然のアミノ酸も含む。非天然のアミノ酸には、例えば、上記記載した天然のアミノ酸がN-アルキル化されたN-アルキルアミノ酸、ペプチド結合を形成する窒素が分岐した若しくは分岐しない低級（例えば、C 1-C 5の、好ましくは、C 1-C 3、より好ましくはC 1）のアルキル基で修飾されたもの、が含まれる。N-アルキルアミノ酸においては、好ましくはN-エチルアミノ酸、N-ブチルアミノ酸又はN-メチルアミノ酸であり、さらに好ましくはN-メチルアミノ酸である。また、非天然のアミノ酸には、D型アミノ酸（D-アミノ酸とも記する）、 β -アミノ酸、 γ -アミノ酸、アミノ酸変異体、アミノ酸誘導体等の化学修飾されたアミノ酸、ノルロイシンやオルニチン等の生体内でタンパク質の構成材料とならないアミノ酸などが含まれる。さらに、天然のアミノ酸の側鎖に官能基がさらに付加された又は別の官能基に置換されたアミノ酸（例えば、側鎖のアリーレン基、アルキレン基等の部分に置換や付加を有するアミノ酸、側鎖のアリーレン基、アルキレン基やアルキル基のC数が増加したアミノ酸、側鎖の芳香環に置換を有するアミノ酸や、複素環化や縮合環化したアミノ酸など）が含まれる。

なお、天然のアミノ酸の側鎖に官能基等の構造が付加または置換等されることで、天然のアミノ酸とは異なる性質を付与することができる。例えば、A 4 pは側鎖にピペリジル基が付加されたアラニンであるが、当該ピペリジル基が付加されたことで、非極性アミノ酸グループに属するアラニンとは異なり、塩基性という極性を示す。

すなわち、天然のアミノ酸をその共通する側鎖の性質に基づいて分けた、前述のグループに、同様の側鎖の性質を有する非天然アミノ酸を含めることが出来る。例えば、塩基性アミノ酸に属するアルギニンのN-メチル化アミノ酸であるN-メチルアルギニン（M e R）は、非天然アミノ酸であるが、

塩基性を示すため、塩基性アミノ酸に分類することができる。このように、あるアミノ酸と同様の側鎖の性質を示す非天然アミノ酸についても、保存的アミノ酸置換の対象として含むことができる。

非限定的に、非天然のアミノ酸には、N-メチルアミノ酸、A h p, N l e, H t y, A b u等を含む。例えば、A h p, N l e, A b u, H t yは疎水性アミノ酸に分けることができ、さらに、A h p, N l e, A b uは脂肪族アミノ酸、H t yは芳香族アミノ酸に分けることもできる。なお、N-メチルアミノ酸については、N-アルキルアミノ酸として分類することもでき、N-メチル化されていない元のアミノ酸の側鎖の性質に従い分類することもできる。

[0033] ペプチドAは、具体的には、配列番号2～配列番号34のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるペプチドであることが好ましい。これらの中では、配列番号34に記載のアミノ酸配列からなるペプチドであることが好ましい。

[0034] ペプチドAは、環状ペプチドであることが好ましい。

ペプチドとは、アミノ酸が複数連続した構造をいい、ポリペプチド、たんぱく質をもその意味に包含する。なお、本願においてアミノ酸とは、天然に存在するアミノ酸（天然アミノ酸）だけではなく、天然に存在しないアミノ酸（非天然アミノ酸）をも包含する。

また、本願においては、合成後環状化により環状部が形成されたペプチド、当該ペプチドをさらに化学修飾して得られるペプチド、ペプチドとペプチドに結合した物質の複合体も、本発明のペプチドに含まれる。

[0035] 本明細書において、ペプチドの環状化のためにアミノ酸の一部を改変する場合がある。ペプチドには、そのような一部の改変がなされたアミノ酸を含むペプチドも包含する。環状化のための改変の例として、N末端に位置するアミノ酸にクロロアセチル基を付加し、ペプチド中のシステイン残基と結合し環状化するような場合がある。クロロアセチル基が付加された各種（天然/非天然）アミノ酸を含むペプチドも本願のペプチドに包含される。

[0036] 環状ペプチドとは、ペプチド中の2つのアミノ酸が結合し、その全部または一部が環状になっているものをいう。なお、本願においては、ペプチド中のアミノ酸が架橋構造を形成したもの、ラクタム環形成又はマクロ環化反応により環状構造を形成したものや、ラッセペプチド状構造を有するもの等をも包含される。すなわち、本願において環状ペプチドは、その一部が環状構造を形成するものであればよく、直鎖部を有していてもよい。

[0037] ペプチドは、一般的に生体内において代謝安定性が悪く、またサイズが大きいので細胞膜を透過しづらいという問題がある。そのような課題に対し、ペプチドを環状化させるという方法がとられてきた。ペプチドを環状化すると、プロテアーゼ耐性が向上し代謝安定性が向上し、またコンフォメーション変化にも制限が加わるため、剛直性が増して膜透過性や標的タンパク質との親和性が向上することが示唆されてきた。

[0038] ペプチドの環化については、公知の方法に従って行うことができる。これに限られるものではないが、例えば、ペプチドに2個以上のシステイン残基を含むよう設計することで、翻訳された後、ジスルフィド結合により環状構造を形成できる。また、Gotoらの方法(Y. Goto, et al. ACS Chem. Biol. 3 120-129 (2008))に従い、遺伝暗号のリプログラミング技術により、N末端にクロロアセチル基を有するペプチドを合成し、ペプチド中にシステイン残基を配置しておくことによっても環状化できる。これにより、翻訳後に自発的にメルカプト基がクロロアセチル基に求核攻撃し、ペプチドがチオエーテル結合により環状化する。遺伝暗号のリプログラミング技術により、結合して環状を形成するその他のアミノ酸の組合せをペプチド内に配置して環状化してもよい。あるいは、N末端にシクロアミドを有するペプチドを合成し、ペプチド中にL-2-アミノアジピン酸残基を配置し、それらの間で結合することによって、環状化してもよい。このように、公知の環状化方法であれば、特に制限されず用いることができる。

[0039] ペプチドAのペプチド長

ペプチドAのペプチド長（アミド結合の数）は特に限定されないが、総アミノ酸残基（ペプチドに結合した物質又は当該物質とペプチドを結合するリンカーがアミノ酸を含む場合は、それらのアミノ酸は含めない）が、20残基以内が好ましい。好ましくはアミノ酸が6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、11以上であり、好ましくはアミノ酸が19以下、18以下、17以下、16以下、15以下である。

[0040] ペプチドAをコードする核酸

この明細書は、ペプチドA（c-Metタンパク質結合ペプチド）をコードする核酸をも記載する。本明細書において「核酸」は、天然であっても非天然であってもよく、DNA、RNA、及びこれらのキメラを含むが、これらに限定されない。

[0041] リンカー

ペプチド複合体に用いられるリンカーは、ペプチド複合体がc-Metタンパク質と結合できる限り、その種類や長さは特に限定されない。リンカーの例は、アミノ酸リンカー（ペプチドリリンカー）、化学リンカー、脂肪酸リンカー、核酸リンカー、糖鎖リンカーなどがあり、例えば化学リンカーとペプチドリリンカーなどの複合体であってもよい。化学リンカーとしては、例えば、PEG（Polyethyleneglycol）リンカーが挙げられる。また、リンカーは、脂肪酸から誘導される二価化学部分を含む脂肪酸リンカーでもよい。アミノ酸（ペプチド）リンカーは、少なくとも1個の任意のアミノ酸を含むリンカーであり、例えば、米国特許第7,271,149号に記載のような、配列[Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n（式中、nは1,2,3,4,5または6である）を有するペプチドなどのグリシン-リッチペプチドや、米国特許第5,525,491号に記載のセリン-リッチペプチドリリンカーを用いることができる。それらリンカーは、公知の方法又はそれに準ずる方法でc-Metタンパク質結合ペプチドに結合させることができる。例えば、c-Metタンパク質結合ペプチドの末端のCys残基にリンカーを結合させることで、リンカーをc-Metタンパク

質結合ペプチドに結合させることができる。また、c-Metタンパク質結合ペプチドのC末端以外に含まれるアミノ酸にリンカーを結合させることもできる。

[0042] リンカーの好ましい例は、PEGリンカーである。PEGリンカーは、ポリエチレングリコール（PEG）又はポリエチレングリコール（PEG）誘導体を含むリンカーである。PEGリンカーは、アミノ酸を含むものであってもよい。PEGリンカーは、PEG分子単位を8個以上含むものが好ましい。リンカーの具体例は、（1）配列番号35～41のいずれかに記載の配列を有するリンカーであるか、（2）配列番号35～41のいずれかに記載の配列において1～3個のアミノ酸（アミノ酸はリンカーとして使用可能なアミノ酸であれば特に限定はされないが、例えばS、G及びK並びにそれらのアミノ酸のいずれか又は2つ以上）が、置換、欠失、付加又は挿入された配列からなるリンカーである。

[0043] ペプチドA、リンカー及びペプチド複合体は、公知の方法（例えば特許第6426103号公報（特許文献2））、又は公知の方法を適宜修正することで作成できる。

[0044] c-Metタンパク質アゴニスト

上記したペプチド複合体は、c-Metタンパク質の多量体化により自己リン酸化を促進することを通じて、HGF様の機能を有する。よって、上記したペプチド複合体は、c-Metアゴニスト（作動薬）や、c-Metタンパク質アゴニストを含む医薬組成物として有用である。

[0045] 医薬組成物

この明細書は、上記したペプチド複合体と薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物をも提供する。上記したペプチド複合体のうち、c-Metタンパク質アゴニストを含む医薬組成物は、虚血性心疾患、急性肝炎、劇症肝炎、肝硬変、胆道閉鎖症、脂肪肝、急性腎不全、慢性腎不全、糖尿病性腎症、急性肺炎、肺線維症、血管障害、心筋梗塞、拡張型心筋症、皮膚潰瘍、脳梗塞、閉塞性動脈硬化症、胃潰瘍及び筋萎縮性側索硬化症からなる群より

選択される疾患の治療又は予防に用いられる。

[0046] 本発明に係る医薬組成物は、本発明に係るペプチド複合体を有効成分として含む。HGF様の機能を有することから、細胞増殖促進、細胞遊走促進、アポトーシス抑制、形態形成誘導、血管新生、組織や臓器の再生や保護に有用であり、これらが関連する疾患の治療又は予防剤として用いられる。かかる疾患としては、例えば、急性肝炎、劇症肝炎、肝硬変、胆道閉鎖症、脂肪肝、急性腎不全、慢性腎不全、糖尿病性腎症、急性肺炎、肺線維症、血管障害、心筋梗塞、拡張型心筋症、皮膚潰瘍、脳梗塞、閉塞性動脈硬化症、胃潰瘍及び筋萎縮性側索硬化症が挙げられるが、これらに限定されない。

[0047] 上記医薬組成物の投与形態は特に限定されず、経口的投与でも非経口的投与でもよい。非経口的投与としては、例えば、筋肉内注射、静脈内注射、皮下注射等の注射投与、経皮投与、経粘膜投与（経鼻、経口腔、経眼、経肺、経膣、経直腸）投与等が挙げられる。

医薬組成物中のペプチドは、代謝及び排泄されやすい性質に鑑みて、各種の修飾を行うことができる。例えば、ポリペプチドにポリエチレングリコール（PEG）や糖鎖を付加して血中滞留時間を長くし、抗原性を低下させることができる。また、ポリ乳酸・グリコール（PLGA）などの生体内分解性の高分子化合、多孔性ヒドロキシアパタイト、リボソーム、表面修飾リボソーム、不飽和脂肪酸で調製したエマルジョン、ナノパーティクル、ナノスフェア等を徐放化基剤として用い、これにポリペプチドを内包させてもよい。経皮投与する場合、弱い電流を皮膚表面に流して角質層を透過させることもできる（イオントフォoresis法）。

[0048] 医薬組成物は、有効成分をそのまま用いてもよいし、薬学的に許容できる担体、賦形剤、添加剤等を加えて製剤化してもよい。剤形としては、例えば、液剤（例えば注射剤）、分散剤、懸濁剤、錠剤、丸剤、粉末剤、坐剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤、シロップ剤、トローチ剤、吸入剤、軟膏剤、点眼剤、点鼻剤、点耳剤、パップ剤等が挙げられる。

製剤化は、例えば、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、溶解剤、溶解補助

剤，着色剤，矯味矯臭剤，安定化剤，乳化剤，吸収促進剤，界面活性剤，pH調整剤，防腐剤，抗酸化剤などを適宜使用し，常法により行うことができる。

[0049] 製剤化に用いられる成分の例としては，精製水，食塩水，リン酸緩衝液，デキストロース，グリセロール，エタノール等薬学的に許容される有機溶剤，動植物油，乳糖，マンニトール，ブドウ糖，ソルビトール，結晶セルロース，ヒドロキシプロピルセルロース，デンプン，コーンスターチ，無水ケイ酸，ケイ酸アルミニウムマグネシウム，コラーゲン，ポリビニルアルコール，ポリビニルピロリドン，カルボキシビニルポリマー，カルボキシメチルセルロースナトリウム，ポリアクリル酸ナトリウム，アルギン酸ナトリウム，水溶性デキストラン，カルボキシメチルスターチナトリウム，ペクチン，メチルセルロース，エチルセルロース，キサンタンガム，アラビアゴム，トラガント，カゼイン，寒天，ポリエチレングリコール，ジグリセリン，グリセリン，プロピレングリコール，ワセリン，パラフィン，ミリスチン酸オクチルドデシル，ミリスチン酸イソプロピル，高級アルコール，ステアarylアルコール，ステアリン酸，ヒト血清アルブミン，等が挙げられるがこれらに限定されない。

[0050] 難吸収性薬物の吸収を改善する吸収促進剤として，ポリオキシエチレンラウリルエーテル類，ラウリル硫酸ナトリウム，サポニン等の界面活性剤；グリココール酸，デオキシコール酸，タウロコール酸等の胆汁酸塩；EDTA，サリチル酸類等のキレート剤；カプロン酸，カプリン酸，ラウリン酸，オレイン酸，リノール酸，混合ミセル等の脂肪酸類；エナミン誘導体，N-アシルコラーゲンペプチド，N-アシルアミノ酸，シクロデキストリン類，キトサン類，一酸化窒素供与体等を用いてもよい。

[0051] 丸剤又は錠剤は，糖衣，胃溶性，腸溶性物質で被覆することもできる。注射剤は，注射用蒸留水，生理食塩水，プロピレングリコール，ポリエチレングリコール，植物油，アルコール類等を含むことができる。さらに，湿潤剤，乳化剤，分散剤，安定化剤，溶解剤，溶解補助剤，防腐剤等を加えること

ができる。

[0052] 本発明の医薬組成物は、上記疾患に有用な他の医薬や治療法と併用投与してもよい。

[0053] 本発明の医薬組成物を哺乳類（例えば、ヒト、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、イヌ、ウマ、サル、ブタ、ヒツジ等）、特にヒトに投与する場合の投与量は、症状、患者の年齢、性別、体重、感受性差、投与方法、投与間隔、有効成分の種類、製剤の種類によって異なり、特に限定されないが、例えば、 $30\mu\text{g} \sim 1000\text{mg}$ 、 $100\mu\text{g} \sim 500\text{mg}$ 、 $100\mu\text{g} \sim 100\text{mg}$ を1回又は数回に分けて投与することができる。注射投与の場合、患者の体重により、 $1\mu\text{g}/\text{kg} \sim 3000\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $3\mu\text{g}/\text{kg} \sim 1000\mu\text{g}/\text{kg}$ を1回又は数回に分けて投与してもよい。

[0054] 治療方法

この明細書は、対象（例えば哺乳類や患者）に、有効量のペプチド複合体、又は有効量の医薬組成物を投与する工程を含む、上記した各種疾患の治療方法をも提供する。また、この明細書は、上記した医薬組成物の製造における、ペプチドA、又は上記したペプチド複合体の使用や、ペプチドA、又は上記したペプチド複合体を用いる上記した医薬組成物の製造方法をも記載する。

[0055] 培養用培地添加物や培地

この明細書は、上記したペプチド複合体を含む培養用培地添加物や、ペプチド複合体を含む培養用培地をも提供する。この培養用培地添加物は、哺乳類由来の細胞又は組織を培養するために用いられる。培養する細胞の例としては、これに限定されるものではないが、体細胞、生殖細胞や、生体を構成する全ての組織や細胞へ分化し得る能力を有する細胞である多能性幹細胞が挙げられる。多能性幹細胞としては、例えば、ES細胞、精子幹細胞、多能性生殖幹細胞、胚性生殖細胞、iPS細胞、培養線維芽細胞又は骨髄幹細胞由来の細胞が挙げられる。また、それら幹細胞と体細胞との融合細胞であってもよく、ストレスや細胞刺激によって誘導・選抜される多能性幹細胞や、

体細胞の核を核移植することによって作成された初期胚を培養することによって樹立した多能性幹細胞であってもよい。また、培養する組織の例としては、細胞から分化された組織や、身体から取り出された組織が挙げられる。例えば、この培養用培地添加物は、再生した組織や臓器移植のための臓器の保護等に使用することが可能である。

細胞又は組織は、ヒト、サル、チンパンジー等の霊長目由来の細胞又は組織であることが好ましく、より好ましくはヒト由来である。

[0056] 培地は、細胞又は組織を培養するための培地であれば特に限定はされないが、ヒトHGFを添加して使用する培地が好ましい。血清培地であってよく、好ましくは無血清培地や低血清培地である。

培養用培地添加物は、溶液の形態であっても、乾燥した固体（例えば、固形状、粉末状等）の形態であってもよい。溶液の形態である場合には、そのまま培養用の培地として用いてもよいし、溶媒で希釈し、必要に応じて上述した添加剤を加えたものを、培養用の培地として用いてもよい。希釈する際に用いる溶媒としては、例えば、水、緩衝液、生理食塩水、各種細胞や組織培養に用いられる培地等が挙げられ、これらは単独で用いても、2種以上を組み合わせ用いてもよい。

培養用培地添加物が乾燥した固体の形態である場合には、例えば、水、緩衝液、生理食塩水、各種細胞や組織培養に用いられる培地等の溶媒に溶解し、必要に応じて上述した添加剤を加えたものを、培養用の培地として用いてもよい。

細胞又は組織を培養するための培地中、又はこれから得られた細胞用の培地中の本発明のペプチド複合体の含有量は、培養する細胞または組織によって当業者が任意に設定することができるが、例えば、組成物全量又は培地全量に対して、最終濃度として、約0.01～約10000nmol/L、好ましくは約0.1～約1000nmol/L、より好ましくは約0.5～約1000nmol/L、更に好ましくは約1～約100nmol/Lであり得る。

[0057] DDSキャリア

上記したペプチドAは、c-Metタンパク質と結合する性質を有する。このため、ペプチドAやペプチドAを含むペプチド複合体は、公知のc-Metタンパク質へ送達したい物質、例えば薬剤と結合することで、DDSキャリア（薬剤送達用担体）や、薬剤送達用複合体として機能する。この明細書は、そのようなDDSキャリアや薬剤送達用複合体をも開示する。ペプチドAやペプチド複合体と、薬剤とは、公知の方法を用いて、結合させることができる。

実施例

[0058] 略語（一般）

オングストローム（単位）としてÅ；
ウシ血清アルブミンとしてBSA；
ジメチルスルホキシドとしてDMSO；
ジメチルホルムアミドとしてDMF；
N，N-ジイソプロピルエチルアミンとしてDIEAもしくはDIEA；
3，6-ジオキサー1，8-オクタン-ジチオールとしてDODT；
ダルベッコ改変イーグル培地としてDMEM
50％効果濃度としてEC50；
上皮成長因子（Epidermal Growth Factor）としてEGF；
9-フルオレニルメチルオキシカルボニルとしてFmoc；
ウシ胎児血清としてFBS；
N²，N⁶-ビス（（9H-フルオレン-9-イル）メトキシ）カルボニル）-L-リジンとしてFmoc-Lys（Fmoc）-OH；
グラム（単位）としてg；
O-（7-アザベンゾトリアゾール-1-イル）-N，N，N'，N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸塩としてHATU；
HGF受容体としてHGF-R；

液体クロマトグラフィー質量分析計としてLC-MSもしくはLC/MS；
ミリリットル（単位）としてmL；モラー（単位）としてM；マイクロリットル；
（単位）として μ L；
ミリモラー（単位）としてmM；
ミリグラム（単位）としてmg；
アセトニトリルとしてMeCN；
分（単位）としてmin；
ミリメートル（単位）としてmm；
ナノメートル（単位）としてnm；
腎上皮細胞用基本培地（Renal Epithelial Cell Basal Medium）としてREBM；
回転毎分（単位）としてrpm；
トリフルオロ酢酸としてTFA；
トリイソプロピルシランとしてTIS

[0059] 略語（非天然アミノ酸）

MeF N-メチル-L-フェニルアラニン

MeA N-メチル-L-アラニン

Ahp (S)-2-アミノヘプタン酸

Nle L-ノルロイシン

Hty (S)-2-アミノ-4-(4-ヒドロキシフェニル)ブタン酸

Abu (S)-2-アミノブタン酸

MeC N-メチル-L-システイン

PEG4c 1-アミノ-3, 6, 9, 12-テトラオキサー15-ペンタデカン酸

PEG8c 1-アミノ-3, 6, 9, 12-テトラオキサペンタデカン-15-オイック酸

PEG12c 1-アミノ-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24,

27, 30, 33, 36-ドデカオキサノナトリアコンタン-39-オイック酸

cPEG1c 3, 3'-オキシジプロピオン酸

cPEG9c 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28-ノナオキサヘントリアコンタンジオイック酸

cPEG17c 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52-ヘプタデカオキサペンタペンタコンタンジオイック酸

OCOPEG13OCO 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33-ウンデカオキサペンタトリアコンタン-1, 35-ジイルビス(炭酸水素塩)

実施例 1

[0060] 化学合成

以下の実施例における化学合成において使用された全ての原料、ビルディングブロック、試薬、酸、塩基、固相樹脂、溶媒は、市販品をそのまま用いたか、もしくは当業者にて有機化学的手法を用いて合成できるものである。なお、保護基を含むアミノ酸は特記が無い限り市販品をそのまま用いた。

固相樹脂におけるペプチド鎖の伸長は、それぞれの実施例に記載された樹脂を出発原料とし、通常用いられるペプチドカップリング反応条件と Fmoc 除去反応条件を用いて行った。反応はペプチド自動合成機である Biotage 社の Siro 1 を使用し、製造元のマニュアルに従って行った。使用される一般的なアミノ酸を下記に列挙し、側鎖保護基はカッコ内に示した。

Fmoc-Trp(Boc)-OH; Fmoc-Thr(tBu)-OH;
Fmoc-N-Me-Gly-OH; Fmoc-Asp(OtBu)-OH;
Fmoc-N-Me-Phe-OH; Fmoc-Ala-OH; Fmoc-N-Me-Ala-OH; Fmoc-His(Trt)-OH; Fmoc-Tyr(tBu)-OH; Fmoc-Val-OH; Fmoc-HydPro(tBu)-OH; Fmoc-Cys(Trt)-OH; Fmoc-

Lys (Mtt) -OH; Fmoc-Ser (tBu) -OH; Fmoc-N-Me-Ser (tBu) -OH。

得られた粗精製ペプチドの精製方法として、Waters社AutoPurification System-SQD2 single quadrupole mass spectrometerで逆相分取HPLCを使用し、目的物由来のm/zイオンをモニタリングしながら溶出した。ESI-positiveのスキャンモードで得られるマススペクトルと目的物の分子式より計算される多価イオンを含むマススペクトルが使用した質量分析器の誤差範囲で一致しているのを確認した。なお、使用したカラムを含む精製条件はそれぞれの実施例に示した。

化学合成されたペプチドの構造決定は、目的配列に従って用いたアミノ酸と必要に応じて用いたビルディングブロックを考慮し計算された分子量を、質量スペクトル分析法におけるESI-MS (+) により確認した。なお、”ESI-MS (+)” とは、正イオンモードで実施したエレクトロスプレーイオン化質量スペクトル分析法を示す。検出された質量は “m/z” 単位表記によって報告された。なお、分子量がおおよそ1000より大きい化合物は、2価イオンまたは3価イオンとして高頻度で検出された。

実施例 2

[0061] c-Met アゴニスト活性を有するペプチドの同定

c-Met アゴニストペプチドは、Recombinant Human HGF R/c-MET Fc Chimera His-tag Protein (R&D systems社) をターゲットとし、国際公開WO2014/119600号、国際公開 WO2012/033154号、又は国際公開 WO2007/066627号に記載されているスクリーニング方法で、同定した。当該ペプチドが実際にc-Met アゴニスト活性を持つかどうかを確認する目的で、それらのペプチドを化学合成した。なお、ペプチド2つがリンカーで結合した、ホモダイマーの形 (ペプチド複合体) で合成した。合成したペプチド複合体に含まれるペプチド部分のアミノ酸配

列を、表 1 に示し、リンカー配列を表 2 に示す。また、合成したペプチド複合体（ペプチドとリンカーの組合せ）については表 3 及び 4 に示す。

[0062] 表 1 : ペプチド部分のアミノ酸配列

[表1-1]

Peptide SEQ ID No.	GF peptide number	SEQ														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
2	GFs_c-Met_0012p	MeF	V	Y	V	S	MeF	D	D	D	Ahp	P	R	W	S	MeC
3	GFs_c-Met_0012_17p	MeA	V	Y	V	S	MeF	D	D	D	Ahp	P	R	W	S	MeC
4	GFs_c-Met_0012_18p	F	V	Y	V	S	MeF	D	D	D	Ahp	P	R	W	S	MeC
5	GFs_c-Met_0012_19p	A	V	Y	V	S	MeF	D	D	D	Ahp	P	R	W	S	MeC
6	GFs_c-Met_0012_1p	MeF	T	Y	V	S	MeF	D	D	D	Ahp	P	R	W	S	MeC
7	GFs_c-Met_0012_2p	MeF	W	Y	V	S	MeF	D	D	D	Ahp	P	R	W	S	MeC
8	GFs_c-Met_0012_3p	MeF	V	D	V	S	MeF	D	D	D	Ahp	P	R	W	S	MeC
9	GFs_c-Met_0012_4p	MeF	V	A	V	S	MeF	D	D	D	Ahp	P	R	W	S	MeC
10	GFs_c-Met_0012_5p	MeF	V	Y	V	S	MeF	D	V	D	Ahp	P	R	W	S	MeC
11	GFs_c-Met_0012_6p	MeF	V	Y	V	S	MeF	D	P	D	Ahp	P	R	W	S	MeC
12	GFs_c-Met_0012_7p	MeF	V	Y	V	S	MeF	D	D	D	Nle	P	R	W	S	MeC
13	GFs_c-Met_0012_8p	MeF	V	Y	V	S	MeF	D	D	D	Hty	P	R	W	S	MeC
14	GFs_c-Met_0012_9p	MeF	V	Y	V	S	MeF	D	D	D	S	P	R	W	S	MeC
15	GFs_c-Met_0012_10p	MeF	V	Y	V	S	MeF	D	D	D	Ahp	P	S	W	S	MeC
16	GFs_c-Met_0012_11p	MeF	V	Y	V	S	MeF	D	D	D	Ahp	P	R	W	Abu	MeC
17	GFs_c-Met_0012_12p	MeF	V	Y	V	S	MeF	D	D	D	Ahp	P	R	W	A	MeC

[0063]

[表1-2]

18	GFs_c-Met_0012_13p	MeF	V	Y	V	S	MeF	D	D	D	Ahp	P	R	W	D	MeC
19	GFs_c-Met_0012_14p	MeF	V	Y	V	S	MeF	D	D	D	Ahp	P	R	W	H	MeC
20	GFs_c-Met_0012_15p	MeF	V	Y	V	S	MeF	D	D	D	Ahp	P	R	W	Q	MeC
21	GFs_c-Met_0012_16p	MeF	V	Y	V	S	MeF	D	D	D	Ahp	P	R	W	V	MeC
22	GFs_c-Met-00014295p	MeF	E	A	V	S	MeF	D	S	D	Ahp	P	R	W	A	MeC
23	GFs_c-Met-00014298p	MeF	E	A	V	S	MeF	D	P	D	Ahp	P	R	W	A	MeC
24	GFs_c-Met-00014301p	MeF	E	A	V	S	MeF	D	P	D	Ahp	P	R	W	S	MeC
25	GFs_c-Met-00014296p	MeF	Q	A	V	S	MeF	D	S	D	Ahp	P	R	W	A	MeC
26	GFs_c-Met-00014299p	MeF	Q	A	V	S	MeF	D	P	D	Ahp	P	R	W	A	MeC
27	GFs_c-Met-00014302p	MeF	Q	A	V	S	MeF	D	P	D	Ahp	P	R	W	S	MeC
28	GFs_c-Met-00014303p	MeF	T	R	V	S	MeF	D	S	D	Ahp	P	R	W	S	MeC
29	GFs_c-Met-00014306p	MeF	T	A	V	S	L	D	S	D	Ahp	P	R	W	S	MeC
30	GFs_c-Met-00014304p	MeF	T	A	V	S	MeF	D	S	D	R	P	R	W	S	MeC
31	GFs_c-Met-00014294p	MeF	T	A	V	S	MeF	D	S	D	Ahp	P	R	W	A	MeC
32	GFs_c-Met-00014297p	MeF	T	A	V	S	MeF	D	P	D	Ahp	P	R	W	A	MeC
33	GFs_c-Met-00014300p	MeF	T	A	V	S	MeF	D	P	D	Ahp	P	R	W	S	MeC
34	GFs_c-Met-00014336p	MeF	T	A	V	S	MeF	D	E	D	Ahp	P	R	W	S	MeC

[0064] 表2：リンカー配列

[表2]

Linker SEQ ID No.	リンカー				
35	PEG12c	K	PEG12c		
36	G	K	cPEG9c	K	G
37	G	K	OCOPEG13OCO	K	G
38	G	K	cPEG17c	K	G
39	PEG4c	K	PEG4c		
40	PEG8c	K	PEG8c		
41	G	K	cPEG1c	K	G

[0065] 表3：ペプチド複合体

[表3]

表3 ペプチド複合体	ペプチド部分 Peptide SEQ ID No.	リンカー部分 SEQ ID No.	c-Metアゴニスト活性 (2 or 1)	ESI (m/z)	[M+XH] ⁺ X ⁺
1	2	35	2	1300.6	4
2	3	35	1	1683.4	3
3	4	35	1	1724.9	3
4	5	35	1	1674.2	3
5	7	35	2	1792.0	3
6	8	35	2	1702.1	3
7	10	35	2	1723.7	3
8	12	35	2	1725.0	3
9	14	35	2	1281.0	4
10	15	35	1	1687.9	3
11	16	35	2	1732.9	3
12	18	35	2	1752.8	3
13	19	35	2	1767.5	3
14	20	35	2	1761.4	3
15	21	35	2	1742.6	3
16	9	41	1	1401.2	3

[0066] 表4：ペプチド複合体

[表4]

表4 ペプチド複合体	ペプチド部分 Peptide SEQ ID No.	リンカー部分 SEQ ID No.	c-Metアゴニスト活性 (C50; nM)	ESI (m/z)	[M+XH]X+
17	2	35	0.76	1300.6	4
18	6	35	1.31	1301.6	4
19	9	35	1.22	1254.6	4
20	11	35	2.22	1291.6	4
21	13	35	2.17	1325.6	4
22	17	35	2.37	1292.8	4
23	9	38	0.91	1227.3	4
24	9	36	1.27	1139.2	4
25	22	38	0.81	1220.2	4
26	22	36	0.75	1132.1	4
27	23	38	2.37	1225.2	4
28	23	36	1.24	1137.1	4
29	24	38	0.88	1233.2	4
30	24	36	0.81	1145.1	4
31	25	38	0.68	1219.7	4
32	25	36	0.61	1131.6	4
33	26	38	2.05	1224.7	4
34	26	36	1.26	1136.7	4
35	27	38	0.92	1232.8	4
36	27	36	0.73	1144.6	4
37	28	38	0.49	1256.8	4
38	28	36	0.65	1168.7	4
39	29	38	1.44	1190.3	4
40	29	36	2.13	1102.1	4
41	30	38	0.32	1140.6	4
42	30	36	0.33	1228.8	4
43	31	38	0.45	1206.2	4
44	31	36	0.33	1118.2	4
45	32	38	0.71	1211.2	4
46	32	36	0.67	1123.1	4
47	33	38	0.50	1219.2	4
48	33	36	0.35	1131.1	4
49	34	37	0.67	1177.2	4
50	34	38	0.27	1235.3	4
51	34	36	0.24	1147.1	4

実施例 3

[0067] c-Metアゴニスト活性を有するペプチドの化学合成

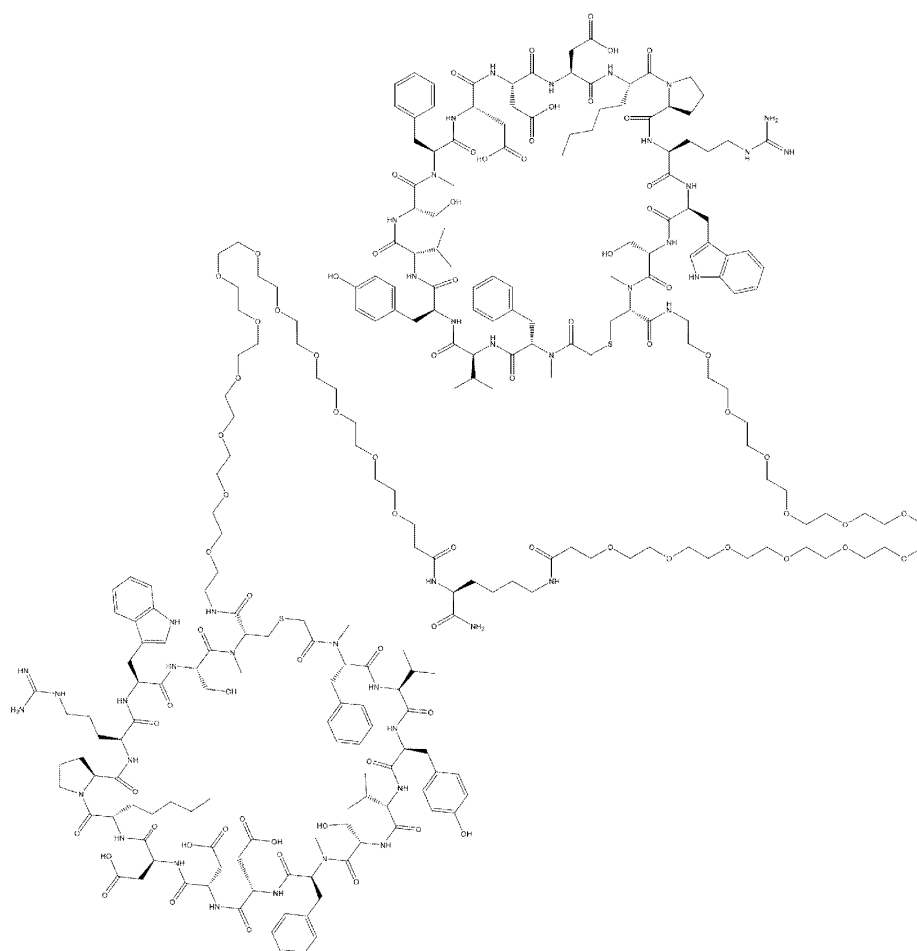
[実施例3-1]

表3に記載のペプチド複合体については、他に合成実施例が無い限り、以下に記載のペプチド複合体と同様に合成した。なお、表3におけるESI-MS (m/z) は、ESI-MS (+) 観測値を示し、[M+XH] X+は

、その場合におけるプロトン付加数を $(M + XH)X +$ として示したときの X の値を示す。

G F s c-M e t 0 0 1 2 7 複合体 (G F s c-M e t 0 0 1 2 7-PEG 1 2 c-K ダイマー : 表 3 におけるペプチド複合体 N o . 8) の合成

[0068] [化1]



[0069] NovaPEG Rink Amide resin (メルク, 0.53 mmol/g, 0.005 g) を用い、前述の一般的方法にて Fmoc 基の除去から開始し、目的のペプチドを合成した。その際、Biota

ge社のSiro lを固相合成機として使用し、製造元のマニュアルに従って合成を行った。固相樹脂にFmoc-Lys(Fmoc)-OHを導入後、両Fmoc基を除去し、Lys上の2つのアミノ基から同時に伸長させることで合成を行った。各残基の導入には樹脂1当量に対し、Fmoc-AA/HATU/DIPEA(8.4当量/7.8当量/16.8当量)を用い、反応を行った。また、Fmoc除去は20%ピペリジンのDMF溶液と25℃下、5分間反応させた後、溶液を除去後、再度20%ピペリジンのDMF溶液を加え15分間反応させた。クロロアセチル基の導入は前工程で得られたFmoc保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し、前述した方法で α -アミノ基のFmoc基を除去したのち、0.3Mクロロ酢酸のDMF溶液(8.4当量)、0.28M HATUのDMF溶液(7.8当量)、1.05M DIPEAのDMF溶液(16.8当量)を固相樹脂に加え25℃下、30分間振盪を2回繰り返すことにより行った。側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは、以下の方法で実施した。まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMFで5回と塩化メチレンで3回洗浄した後、減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテルA(TFA/H₂O/TIS/DODTの体積比92.5:2.5:2.5:2.5の混合物)を加え、25℃で60分間振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を0℃に冷やした過剰のジエチルエーテル/ヘキサン(1/1)の混合溶媒に加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し(8500 rpm、0℃、30秒間)、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテル/ヘキサンにて洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固体を次の環化反応に用いた。ペプチドの環化反応はペプチドの終濃度が固相樹脂のモル数を基に2.5mMとなるようにDMSOに溶解後、10当量のトリエチルアミンを加えて、25℃で16時間振盪した。得られた反応溶液をEZ-2 Eliteを用いて減圧濃

縮した。

得られた混合物をギルソン社のA S P E C（登録商標） C 1 8カートリッジを用いて固相抽出した。得られた抽出液をE Z - 2 E l i t eを用いて減圧濃縮した。

L C - M Sで分析し、目的物のマスペクトルは主たるピークの一つに観測された。

分析条件：保持時間＝1. 73分；カラム：K i n e t e x（登録商標） E V O C 1 8 1. 7 μ m 2. 1 x 50mm, 100 Å；移動相：A = 0. 025% T F A i n H₂O、B = 0. 025% T F A i n M e C N；温度：60 °C；グラジエント（% B c o n c）：2. 10分間かけて5－95%、その後0. 75分間かけて95－95%；流量：0. 6 mL / m i n

E S I - M S（+） 観測値 m/z = 1725. 0 (M+3H)³⁺ 理論値 m/z = 5170. 91

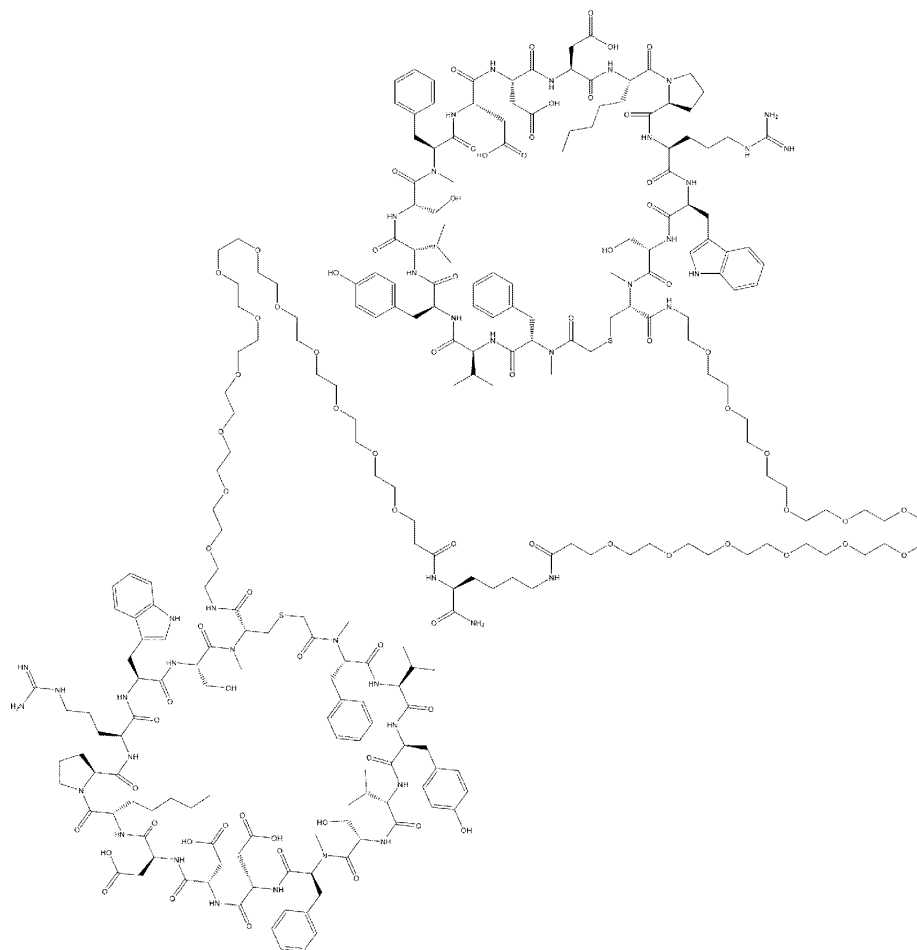
[0070] [実施例3－2]

表4に記載のペプチド複合体については、他に合成実施例が無い限り、以下に記載のペプチド複合体と同様に合成した。なお、表4におけるE S I - M S（ m/z ）は、E S I - M S（+）観測値を示し、[M+XH]^{X+}は、その場合におけるプロトン付加数を（M+XH）^{X+}として示したときのXの値を示す。

G F s c - M e t - 0 0 1 2 複合体（G F s c - M e t - 0 0 1 2 - P E G 1 2 ダイマー；表4におけるペプチド複合体No. 17）の合成

[0071]

[化2]



[0072] Sieber amide resin (渡辺化学, 0.47 mmol/g, 0.11 g) を用い、前述の一般的方法にて Fmoc 基の除去から開始し、目的のペプチドを合成した。その際、Biotage 社の Siro 1 を固相合成機として使用し、製造元のマニュアルに従って合成を行った。固相樹脂に Fmoc-Lys (Fmoc)-OH を導入後、両 Fmoc 基を除去し、Lys の 2 つのアミノ基から同時に伸長させることで合成を行った。各残基の導入には樹脂 1 当量に対し、Fmoc-AA / HATU / DIPEA (8.4 当量 / 8 当量 / 16 当量) を用い反応を行った。また、Fmoc 除去は 0.1 M HOBt 含有 5 % ピペリジンの DMF 溶液

と25℃下、5分間反応させた後、溶液を除去後、再度0.1M HOBt含有5% ピペリジンのDMF溶液と再度15分間反応させた。クロロアセチル基の導入は、前工程で得られたFmoc保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し、前述した方法で α -アミノ基のFmoc基を除去したのち、0.5M クロロ酢酸のDMF溶液(10当量)、0.49M HATUのDMF溶液(9.8当量)、0.5M DIPEAのDMF溶液(10当量)を固相樹脂に加え室温にて30分間振盪することにより行った。側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは、以下の方法で実施した。まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMFで5回と塩化メチレンで3回洗浄した後、減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル A (TFA/H₂O/TIS/DODTの体積比92.5 : 2.5 : 2.5 : 2.5の混合物)を加え、25℃で60分間振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を0℃に冷やした過剰のジエチルエーテル/ヘキサン(1/1)の混合溶媒に加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し(9000 rpm、2分間)、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテル/ヘキサンにて洗浄後、減圧下乾燥した。得られた固体を次の環化反応に用いた。ペプチドの環化反応はペプチドの終濃度が固相樹脂のモル数を基に1mMとなるようにDMSO/アセトニトリル/水(18/1/1)に溶解後、20当量のトリエチルアミンを加えて、25℃で15時間振盪した。得られた反応溶液をEZ-2 Eliteを用いて減圧濃縮した。

得られた混合物は以下の条件を用いて精製した(カラム: Waters XSelect (登録商標) C18 19 x 150mm; 移動相: A = 0.1% TFA in H₂O, B = 0.1% TFA in MeCN; 温度: 40℃; グラジエント(%B conc): 3分間かけて13-38%, その後8分間かけて38-43%, その後1分間かけて4

3-60% ; 流量 : 17 mL/min。

目的物の純度は以下の分析条件のLC/MS (UV波長225 nm) クロマトグラム の面積比から算出し59.97%であった。

- [0073] 分析条件 : 保持時間 = 5.75分 ; カラム : Kinetex (登録商標) EVO C18 2.6 μ m 2.1 x 150mm, 100 Å ; 移動相 : A = 0.025% TFA in H₂O, B = 0.025% TFA in MeCN ; 温度 : 60 °C ; グラジエント (% B conc) : 7.15分間かけて20-60%, その後0.30分間かけて60-95%, その後1.55分間かけて95-95% ; 流量 : 0.5 mL/min
- ESI-MS (+) 観測値 m/z = 1300.6 (M+4H)⁴⁺
理論値 m/z = 5196.56

実施例 4

- [0074] ホスホ-c-Met AlphaLISAアッセイによる本発明のペプチド複合体のc-Met アゴニスト活性測定

本発明のペプチド複合体のc-Metの活性化能(c-Met アゴニスト活性)を評価する為に、c-Metのリン酸化を検証した。

ヒト細胞であるA431細胞を10% FBS (Gibco社)を含むDMEM, high glucose, GlutaMAX (登録商標) Supplement, pyruvate (サーモフィッシャーサイエンティフィック社)で培養した。Accutase (Innovative cell technologies社)を用いて細胞を剥離後、1ウェルあたり10000細胞となるように96穴プレートに播種し、一晩培養した。翌日スタベーションの為0.1% BSA (シグマアルドリッチ社)を含むDMEM, high glucose, GlutaMAX (登録商標) Supplement, pyruvate (サーモフィッシャーサイエンティフィック社)に交換し更に一晩培養した。その後、実施例3で合成したペプチド複合体、又はコントロールとしてRecombinant

Human HGF Protein (R&D systems社)を加え、15分刺激後、AlphaLISA (登録商標) SureFire (登録商標) Ultra™ Phospho-c-Met (Tyr1234/1235) キット (パーキンエルマー社) に付属するLysis Bufferで細胞を溶解した。アッセイはキットのプロトコールに沿って実施し、シグナルの検出にはSpectraMax (登録商標) Paradigm (登録商標) multimode microplate reader (モレキュラーデバイスジャパン社) を使用した。

得られたシグナルをGraphPad Prism (エムデーエフ社) で解析し、HGFで誘導されるシグナルの最大値を100%として、50%以上の活性化を示すものを2、50%以下の活性化を示すものを1として記載した。その結果を表3に示す。なお、同様にモノマーのペプチドを用いて活性測定を行ったが、c-Met アゴニスト活性は示さなかった。

また、同様にして、C50の値をHGFで誘導されるシグナルの50%の活性化を示すペプチドの濃度としてGraphPad Prismで算出した。その結果を表4に示す。なお、本アッセイにおいて、コントロールであるHGFのEC50の値は0.66 nMであった。

さらに、ペプチド (配列番号34) とリンカー (配列番号37) の複合体 (GFs__c-Met-00014336-PEG13ダイマー; 表4における複合体No. 49) について、c-Met アゴニスト活性のグラフを図1に示した。当該ペプチド複合体のEC50は0.72 nMであり、HGFとほぼ変わらないc-Met アゴニスト活性を示した。

これらの結果より、本発明のペプチド複合体は、確かにc-Met アゴニスト活性を有することが示された。

実施例 5

[0075] HUVEC細胞増殖評価

本発明のペプチド複合体の生物活性を評価する為に細胞増殖誘導活性を検証した。

正常ヒトさい帯静脈血管内皮細胞（HUV EC）をHuMedia-EG2（クラボウ社）を使用して培養した。Accutase（Innovative cell technologies社）を用いて細胞を剥離後5% FBS（MBL社）を含むMedium without serum or growth factors（Cell systems社）に再懸濁し、1ウェルあたり10000細胞となるように96穴プレートに播種し、一晩培養した。翌日、実施例2で合成したペプチド（配列番号34）とリンカー（配列番号37）の複合体（GFs__c-Met-00014336-PEG13ダイマー；表4におけるペプチド複合体No. 49）、又はコントロールとしてRecombinant Human HGF Protein（R&D systems社）を加え更に2日間培養した。その後培地を除き、CellTiter-Glo（登録商標）Luminescent Cell Viability Assay試薬（プロメガ社）を用い付属のプロトコールに沿って細胞数を定量した。検出にはSpectraMax（登録商標）Paradigm（登録商標）multimode microplate reader（Molecular Devices社）を使用した。

得られたシグナル値をGraphPad Prismで解析しEC50を算出した。得られた活性のグラフを図2に示した。結果として、HGFのEC50は0.37 nM、当該ペプチド複合体のEC50は0.55 nMと、本発明のペプチド複合体はHGFとほぼ変わらないc-Metアゴニスト活性を示した。

この結果より、本発明のペプチド複合体は、ヒト細胞の増殖を誘導する活性を有することが示された。

実施例 6

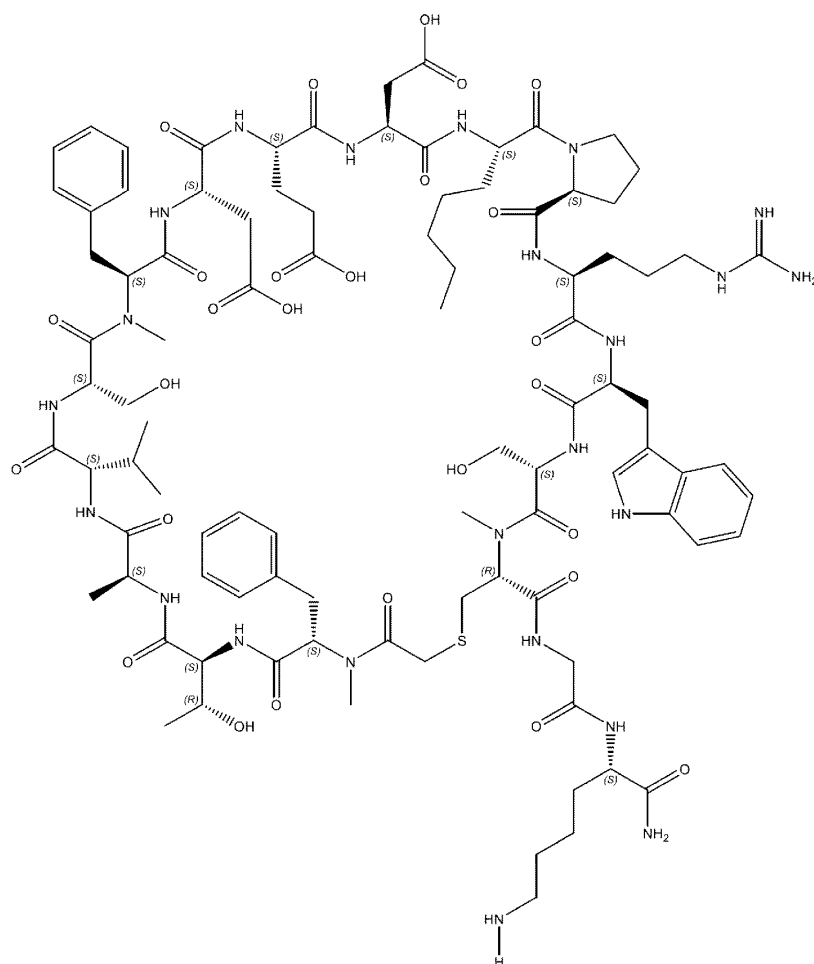
[0076] 以下のペプチド複合体を合成した。

[実施例6-1]

表1におけるSEQ ID No. 34に記載のアミノ酸配列を有する環

状ペプチドの合成

[0077] [化3]



[0078] Sieber amide resin (渡辺化学, 0.65 mmol/g, 0.31 g) を用い、前述の一般的方法にて Fmoc 基の除去から開始し、目的のペプチドを合成した。その際、Biotage 社の Siro 1 を固相合成機として使用し、製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入には樹脂 1 当量に対し、Fmoc-AA / HATU / DIPEA (3.2 当量 / 3 当量 / 6.3 当量) を用い反応を行った。また、Fmoc 除去は 20% ピペリジンの DMF 溶液と 25℃ 下、5 分間反応させた後、溶液を除去後、20% ピペリジンの DMF 溶液と再度 1

5分間反応させた。クロロアセチル基の導入は前工程で得られたFmoc保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し、前述した方法で α -アミノ基のFmoc基を除去したのち、0.5M クロロ酢酸のDMF溶液（5当量）、0.49M HATUのDMF溶液（4.9当量）、0.5M DIPEAのDMF溶液（5当量）を固相樹脂に加え室温にて30分間振盪することにより行った。側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは、以下の方法で実施した。まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMFで5回と塩化メチレンで3回洗浄した後、減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル A (TFA/H₂O/TIS/DODTの体積比92.5:2.5:2.5:2.5の混合物)を加え、25℃で60分間振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を0℃に冷やした過剰のジエチルエーテル/ヘキサン（1/1）の混合溶媒に加えると白濁沈殿が生じ、この混合物を遠心分離し（9000rpm、2分間）、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテル/ヘキサンにて洗浄後、減圧下乾燥した。得られた固体を次の環化反応に用いた。ペプチドの環化反応は、ペプチドの終濃度が固相樹脂のモル数を基に2.5mMとなるようにDMSO/アセトニトリル/水（18/1/1）に溶解後、10当量のトリエチルアミンを加えて、25℃で4時間振盪した。得られた反応溶液をEZ-2 Eliteを用いて減圧濃縮した。

得られた粗生成物は以下の条件を用いて精製し

た（カラム：Waters Xbridge（登録商標） C18 5 μ m 50 x 150mm；移動相：A = 0.1% TFA in H₂O, B = 0.1% TFA in MeCN；温度：40℃；グラジエント（%B conc）：3分間かけて5-30%，その後8分間かけて30-35%，その後1分間かけて35-60%；流量：120mL/min。

目的物の純度は以下の分析条件のLC/MS (UV波長225 nm) クロマトグラムの面積比から算出し96.90%であった。

分析条件：保持時間=3.84分；カラム：Kinetex (登録商標) EVO C18 2.6 μ m 2.1 x 150mm, 100 Å；移動相：A = 0.025% TFA in H₂O, B = 0.025% TFA in MeCN；温度：60 °C；グラジエント (%B conc)：7.15分間かけて20-60%，その後0.30分間かけて60-95%，その後1.55分間かけて95-95%；流量：0.5 mL/min

ESI-MS (+) 観測値m/z = 1027.7 (M+2H)²⁺

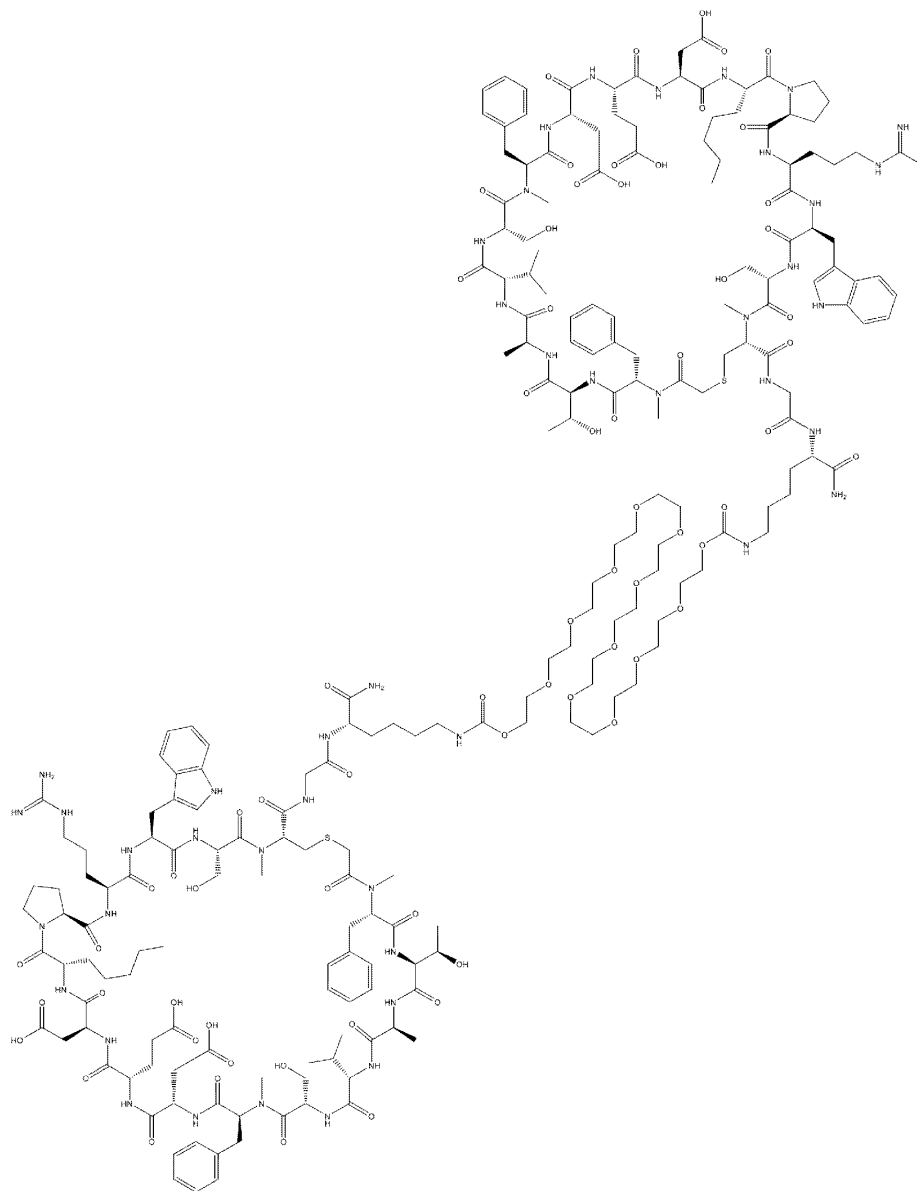
得られた環状ペプチドを、ペプチド複合体の合成に用いた。

[0079] [実施例6-2]

GFs_c-Met-00014336 (GFs_c-Met-00014336-PEG13ダイマー；表4におけるペプチド複合体No. 49)
の合成

[0080]

[化4]



[0081] GF s__c-Met-00014234 (8.0 mg、3.51 μ mol) をDMF (0.2 mL) に溶かし、DIPEA (2.3 μ L、13 μ mol) のDMF 溶液 (23 μ L) 及びビス (2, 5-ジオキソピロリジン-1-イル) (3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33-ウンデカオキサペンタトリアコンタン-1, 35-ジイル) ビスカーボネ

ート (1.38 mg、1.67 μmol) の DMF 溶液 (14 μL) を加え 25℃で16時間攪拌した。

得られた混合物は以下の条件を用いて精製した (カラム: Waters XSelect (登録商標) C18 19 x 150mm; 移動相: A = 0.1% TFA in H_2O , B = 0.1% TFA in MeCN; 温度: 40℃; グラジエント (%B conc): 3分間かけて13-38%, その後8分間かけて38-43%, その後1分間かけて43-60%; 流量: 17 mL/min。

目的物の純度は以下の分析条件の LC/MS (UV波長 225 nm) クロマトグラムの面積比から算出し 96.42%であった。

分析条件: 保持時間 = 5.07分; カラム: Kinetex (登録商標) EVO C18 2.6 μm 2.1 x 150mm, 100Å; 移動相: A = 0.025% TFA in H_2O , B = 0.025% TFA in MeCN; 温度: 60℃; グラジエント (%B conc): 7.15分間かけて20-60%, その後0.30分間かけて60-95%, その後1.55分間かけて95-95%; 流量: 0.5 mL/min

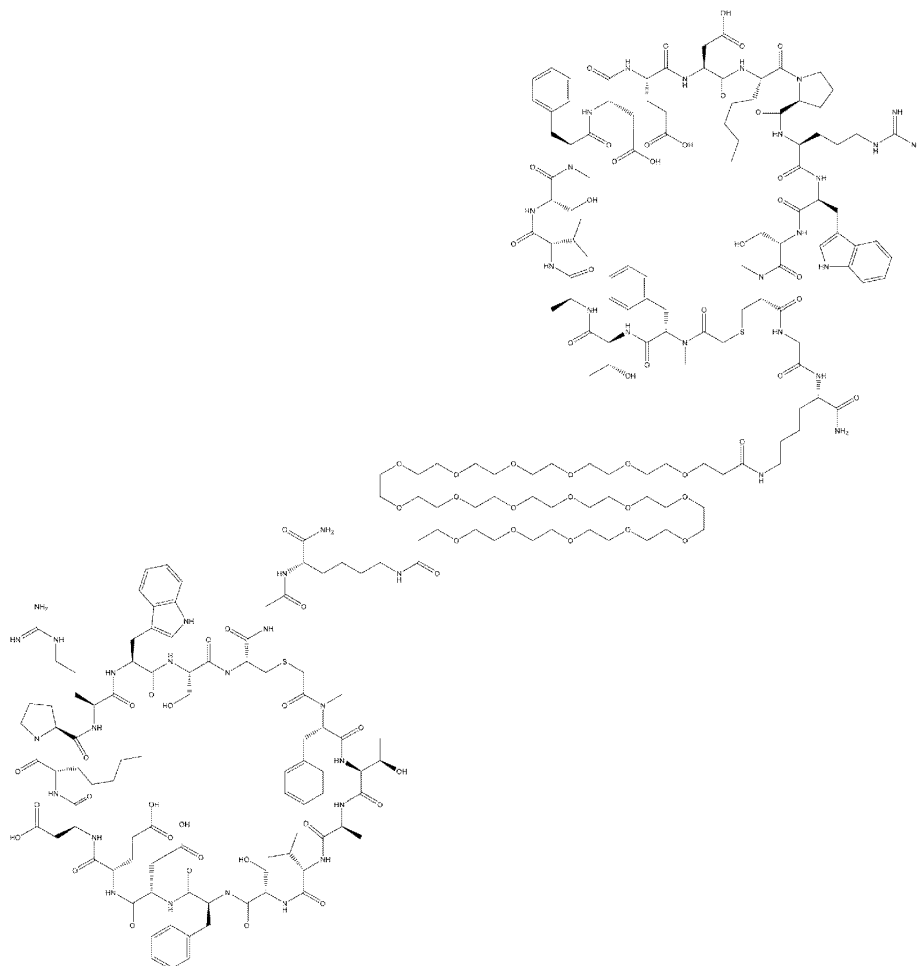
ESI-MS (+) 観測値 m/z = 1177.2 ($\text{M} + 4\text{H}$)⁴⁺ 理論値 m/z = 4703.25

[0082] [実施例 6-3]

GFs_c-Met-00014305 (GFs_c-Met-00014305-PEG17ダイマー; 表4におけるペプチド複合体 No. 50)
の合成

[0083]

[化5]



[0084] 実施例6-1にて合成した環状ペプチド (GFs__c-Met-00014234) (8.0mg、3.51 μ mol)をDMF (0.25mL)に溶かし、トリエチルアミン (2.0 μ L、14mmol)のDMF溶液 (20 μ L)及びビス (2,5-ジオキソピロリジン-1-イル) 4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52-ヘプタデカオキサペンタコンタンジオエート (1.75mg、1.65 μ mol)のDMF溶液 (18 μ L)を加え25℃で16時間攪拌した。

得られた混合物は以下の条件を用いて精製した (カラム: Waters

XSelect (登録商標) C18 5 μ m 19 x 150mm;
移動相: A = 0.1% TFA in H₂O, B = 0.1% TFA in MeCN; 温度: 40 °C; グラジエント (%B conc):
3分間かけて12-37%, その後8分間かけて37-42%, その後1分
間かけて42-60%; 流量: 17 mL/min。

目的物の純度は以下の分析条件のLC/MS (UV波長225 nm) クロ
マトグラムの面積比から算出し94.19%であった。

分析条件: 保持時間=5.92分; カラム: Kinetex (登録商標)
EVO C18 2.6 μ m 2.1 x 150mm, 100 Å; 移
動相: A = 0.025% TFA in H₂O, B = 0.025%
TFA in MeCN; 温度: 60 °C; グラジエント (%B conc): 7.15分間かけて20-60%, その後0.30分間かけて60
-95%, その後1.55分間かけて95-95%; 流量: 0.5 mL/min

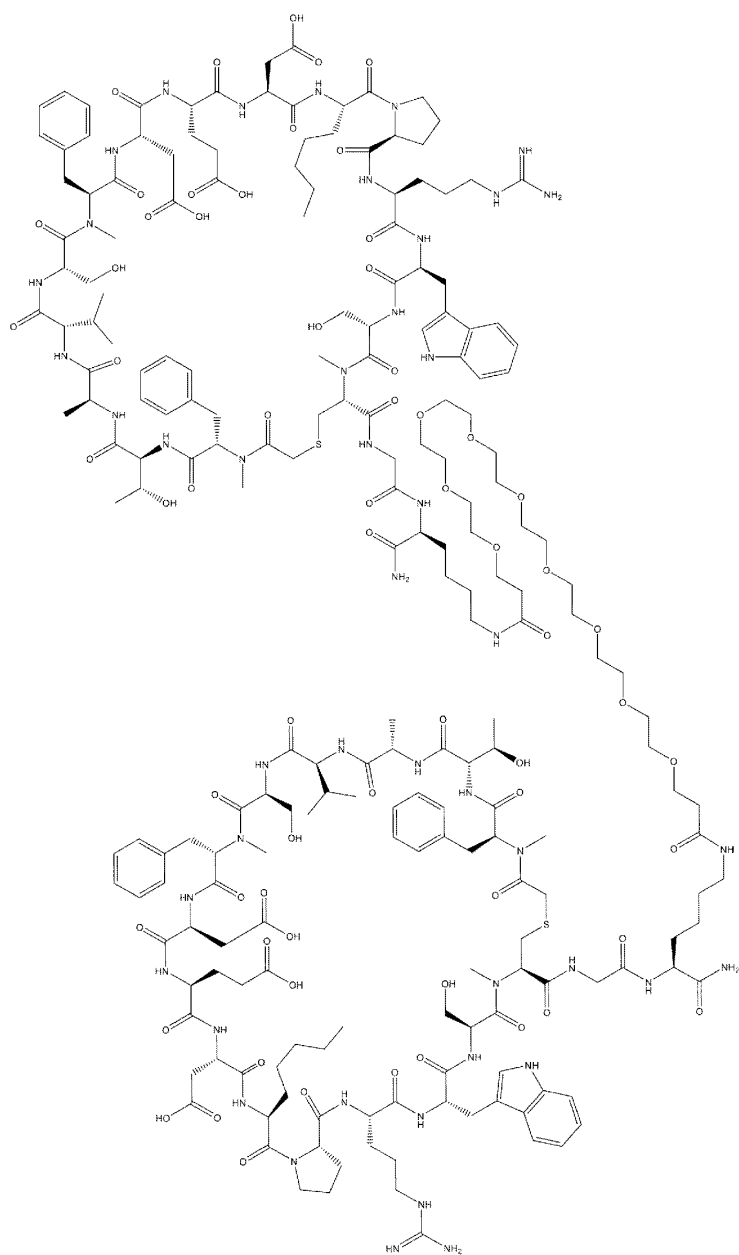
ESI-MS (+) 観測値 m/z = 1235.3 (M+4H)⁴⁺ 理
論値 m/z = 4935.41

[0085] [実施例6-4]

GFs c-Met-00014318 (GFs c-Met-0001
4318-PEG9ダイマー; 表4におけるペプチド複合体No. 51) の
合成

[0086]

[化6]



[0087] GFs_c-Met-00014234 (8.0mg、3.51 μ mol)をDMF (0.25mL)に溶かし、トリエチルアミン (2.0 μ L、14 μ mol)のDMF溶液 (20 μ L)及びピス (2,5-ジオキソピロリジン-1-イル) 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28-ノ

ナオキサヘントリアコンタンジオエート (1.17 mg、1.65 μmol) の DMF 溶液 (12 μL) を加え 25°C で 16 時間攪拌した。

得られた混合物は以下の条件を用いて精製した (カラム: Waters XSelect (登録商標) C18 19 x 150 mm; 移動相: A = 0.1% TFA in H_2O , B = 0.1% TFA in MeCN; 温度: 40 °C; グラジエント (%B conc): 3 分間かけて 11–36%, その後 8 分間かけて 36–41%, その後 1 分間かけて 41–60%; 流量: 17 mL/min。

目的物の純度は以下の分析条件の LC/MS (UV 波長 225 nm) クロマトグラムの面積比から算出し 94.56% であった。

分析条件: 保持時間 = 5.03 分; カラム: Kinetex (登録商標) EVO C18 2.6 μm 2.1 x 150 mm, 100 Å; 移動相: A = 0.025% TFA in H_2O , B = 0.025% TFA in MeCN; 温度: 60 °C; グラジエント (%B conc): 7.15 分間かけて 20–60%, その後 0.30 分間かけて 60–95%, その後 1.55 分間かけて 95–95%; 流量: 0.5 mL/min

ESI-MS (+) 観測値 m/z = 1147.1 ($\text{M}+4\text{H}$)⁴⁺ 理論値 m/z = 4582.2

実施例 7

[0088] Tube formation 評価

ヒト近位尿細管上皮細胞 (RPTEC) を 増殖培地 (Renal Epithelial Cell Basal Medium (REBM) + 0.5% FBS + 2.4 mM L-Alanyl-L-Glutamine + 10 nM Triiodothyronine + 10 ng/mL rh EGF + 100 ng/mL Hydrocortisone Hemisuccinate + 5 $\mu\text{g/mL}$ rh Insulin + 1 μM Epinephrine + 5 u

g/mL Transferrin) (ATCC) で培養した。Trypsin-EDTAを用いて細胞を剥離し、アッセイ培地 (REBM + 0.5% FBS + 2.4 mM L-Alanyl-L-Glutamine + 10 nM Triiodothyronine + 100 ng/mL Hydrocortisone Hemisuccinate + 1 μ M Epinephrine + 5 μ g/mL Transferrin + 1.8 mM CaCl_2) に再懸濁した。

氷上においたCellmatrix (登録商標) Type I-A (新田ゼラチン社) と濃縮培養液 (新田ゼラチン社) と再構成用緩衝液 (新田ゼラチン社) を説明書に従って混合したものにRPTECを再懸濁し、1ウェルあたり200000細胞となるように48ウェルプレートに300 μ Lずつ分注した。CO₂インキュベーター内 (37℃、5% CO₂) にて60分間静置することで上記懸濁液をゲル化させた。

アッセイ培地にHGFを2 nM、EGFを1.6 nM、もしくは実施例2で合成したペプチド (配列番号34) とリンカー (配列番号37) の複合体 (GFs__c-Met-00014336-PEG13ダイマー; 表4におけるペプチド複合体No. 49) を0.08, 0.4, 2, 10 nMとなるように加え、前述のとおりゲル化させた懸濁液が添加されている48ウェルプレートの各ウェルに400 μ Lずつ添加した。CO₂インキュベーター中 (37℃、5% CO₂) にて静置し、3日毎に培地を交換し培養開始から3日後及び8日後に位相差顕微鏡を用いて管腔形成の有無を観察し評価した。

その結果を図3及び図4に示す。なお、図3は3日後の結果であり、aはMOCK (無添加)、bは1.6 nM EGF、cは2 nM HGF、dは2 nMのペプチド複合体 (表4におけるペプチド複合体No. 49) を添加したウェルの観察結果である。また、図4は8日後の結果であり、aはMOCK (無添加)、bは2 nM HGF、cは0.08 nM、dは0.4 nM、eは2 nM、fは10 nMの濃度で実施例2で合成したペプチド (配

列番号34)とリンカー(配列番号37)の複合体(GFs__c-Met-00014336-PEG13ダイマー;表4におけるペプチド複合体No. 49)を添加したウェルの観察結果である。

この結果より、本発明のペプチド複合体はHGFと同じく管腔形成を促進することが示された。また、図4fより、管腔形成だけではなく分岐形成も促進されることが示された。管腔形成は細胞の増殖、遊走及びコラーゲン分解等の多機能作用が必要であるため、本発明のペプチド複合体はHGFと同様の生理活性を有することが示された。

実施例 8

[0089] ヒト Phospho-RTKアレイアッセイ

A431細胞を10% FBS (Gibco社)を含むDMEM, high glucose, GlutaMAX (登録商標) Supplement, pyruvate (サーモフィッシャーサイエンティフィック社)で培養した。Accutase (登録商標) (Innovative cell technologies社)を用いて細胞を剥離後、1ウェルあたり100000細胞となるように6ウェルプレートに播種し、一晚培養した。

翌日スタベーションの為、アッセイ培地(0.1% BSA (Sigma社)を含むDMEM, high glucose, GlutaMAX (登録商標) Supplement, pyruvate (サーモフィッシャーサイエンティフィック社))に交換し更に一晚培養した。その後7.8nMのRecombinant Human HGF Protein (R&D systems社)、もしくは2nMの実施例2で合成したペプチド(配列番号34)とリンカー(配列番号36)の複合体(GFs__c-Met-00014336-PEG9ダイマー;表4におけるペプチド複合体No. 51)を加え、10分刺激後Proteome Profiler Human Phospho-RTK Array Kit (R&D systems) に付属するLysis Bufferで細胞を溶解した

。その後は当該キットのプロトコールに沿って実施し、Western Sure（登録商標）PREMIUM化学発光基質キット（LI-COR）化学発光シグナルはC-Digit（登録商標）（スクラム社）を用いて検出した。

その結果を図5に示す。なお、図5（2）のaは無添加、bはHGF添加、及びcはペプチド複合体添加の結果であり、ペプチド複合体添加時及びHGF添加時において、HGF Rのみが特異的にリン酸化された。よって、本発明のペプチド複合体はHGFと同様の特異的リン酸化パターンを有することが示された。

産業上の利用可能性

[0090] この発明は、医薬産業や生物学産業において利用されうる。

請求の範囲

[請求項1] c-Met タンパク質と結合するペプチドAを含むペプチド複合体であって、

前記ペプチドAは、

$X^1-X^2-X^3-V-S-X^4-D-X^5-D-X^6-P-R-W-X^7-MeC$ (配列番号1) に記載のアミノ酸配列からなるペプチドであるか、又は配列番号1に記載のアミノ酸配列において1～3個のアミノ酸が、置換、欠失、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、

X^1 は、N-アルキル化されてもよいアミノ酸であり、

X^2 は、任意のアミノ酸であり、

X^3 は、任意のアミノ酸であり、

X^4 は、N-アルキル化されてもよい疎水性アミノ酸であり、

X^5 は、任意のアミノ酸であり、

X^6 は、置換を有してもよいアルキル鎖を側鎖に有するアミノ酸又はSであり、

X^7 は、任意のアミノ酸である、

ペプチド複合体。

[請求項2] 請求項1に記載のペプチド複合体であって、

X^1 は、N-メチル化されてもよいA又はN-メチル化されてもよいFであり、

X^2 は、親水性アミノ酸、脂肪族・分岐鎖アミノ酸又は芳香族アミノ酸であり、

X^3 は、親水性アミノ酸、脂肪族アミノ酸又は芳香族アミノ酸であり、

X^4 は、N-メチル化されてもよい疎水性アミノ酸であり、

X^5 は、親水性アミノ酸、脂肪族・分岐鎖アミノ酸又はPであり、

,

X⁷は、親水性アミノ酸又は脂肪族アミノ酸である、
ペプチド複合体。

[請求項3]

請求項1に記載のペプチド複合体であって、

X¹は、N-メチル化されてもよいA又はN-メチル化されてもよいFであり、

X²は、V、T、E、Q、又はWであり、

X³は、A、R、Y、又はDであり、

X⁴は、メチル化されてもよいF又はメチル化されてもよいLであり、

X⁵は、D、E、S、P又はVであり、

X⁶は、(S)-2-アミノヘプタン酸(Ahp)、R、L-ノルロイシン(Nle)、(S)-2,7-ジアミノヘプタン酸(Hty)、又はSであり、

X⁷は、S、A、L- α -アミノブタン酸(Abu)、D、Q、又はVである、

ペプチド複合体。

[請求項4]

請求項1に記載のペプチド複合体であって、

前記ペプチド複合体は、

第1のペプチドと、

第2のペプチドと、

第1のペプチド及び第2のペプチドをつなぐリンカーからなり、

第1のペプチド及び第2のペプチドの少なくとも一方は、前記ペプチドAである、ペプチド複合体。

[請求項5]

請求項4に記載のペプチド複合体であって、

第1のペプチド及び第2のペプチドは、同一でも異なってもよく、
前記ペプチドAである、ペプチド複合体。

[請求項6]

請求項5に記載のペプチド複合体であって、

前記ペプチドAは、

Me F-T-A-V-S-Me F-D-E-D-A h p-P-R
-W-S-Me C（配列番号34）に記載のアミノ酸配列からなるペ
プチドであるか、又は配列番号34に記載のアミノ酸配列において1
～3個のアミノ酸が、置換、欠失、付加又は挿入されたアミノ酸配列
からなり、c-Me t タンパク質と結合するペプチドである、ペプチ
ド複合体。

[請求項7] 請求項6に記載のペプチド複合体であって、前記ペプチドAは、環
状ペプチドである、ペプチド複合体。

[請求項8] 請求項7に記載のペプチド複合体であって、第1のペプチド及び第
2のペプチドは、同一のペプチドAであり、第1のペプチド及び第2
のペプチドのC末端が前記リンカーと結合した、ペプチド複合体。

[請求項9] 請求項8に記載のペプチド複合体であって、前記ペプチドAは、配
列番号2～配列番号34のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるペ
プチドである、ペプチド複合体。

[請求項10] 請求項9に記載のペプチド複合体であって、前記リンカーは、P E
Gリンカーである、ペプチド複合体。

[請求項11] 請求項9に記載のペプチド複合体であって、前記リンカーは、配列
番号35～41のいずれかに記載の配列を有するか、配列番号35～
41のいずれかに記載の配列において1～3個のアミノ酸が、置換、
欠失、付加又は挿入された配列からなるリンカーである、ペプチド複
合体。

[請求項12] 請求項11に記載のペプチド複合体を含む、c-Me t タンパク質
アゴニスト。

[請求項13] 請求項5～12のいずれか1項に記載のペプチド複合体と薬学的に
許容される担体とを含む、医薬組成物。

[請求項14] 請求項13に記載の医薬組成物であって、
虚血性心疾患、急性肝炎、劇症肝炎、肝硬変、胆道閉鎖症、脂肪肝
、急性腎不全、慢性腎不全、糖尿病性腎症、急性肺炎、肺線維症、血

管障害，心筋梗塞，拡張型心筋症，皮膚潰瘍，脳梗塞，閉塞性動脈硬化症，胃潰瘍及び筋萎縮性側索硬化症からなる群より選択される疾患の治療又は予防に用いられる，医薬組成物。

[請求項15] 請求項 1 ～ 1 1 のいずれか 1 項に記載のペプチド複合体を含む培養用培地添加物。

[請求項16] 請求項 1 5 に記載の培養用培地添加物であって，ヒト由来の細胞又は組織を培養するために用いられる培養用培地添加物。